

**Klinische und biochemische Studien
über die sensibilisierenden Eigenschaften von
Chironomus thummi thummi mit
Analysen einiger Antigendeterminanten**

Doris Ziegler

1982

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München

Direktor: Prof.Dr.med.G.Riecker

Abteilung für Pulmonologie

Leiter: Prof.Dr.med.G.Fruhmann

Klinische und biochemische Studien über die sensibilisierenden Eigenschaften von *Chironomus thummi thummi* mit Analysen einiger Antigen determinanten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Doris Ziegler

aus

Edenkoben

1982

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter: Prof.Dr.G.Fruhmann

Mitberichterstatter: Prof.Dr.G.Riecker

Dekan: Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Juli 1982



Meinen Eltern

Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Fruhmann für die Überlassung des Themas und für die Arbeitsmöglichkeit, die er mir in der Pulmonologischen Abteilung, Medizinische Klinik I, Klinikum Großhadern, sowie dem angeschlossenen Forschungslabor gewährte;

Herrn Prof. Braunitzer für die Überlassung des Arbeitsplatzes in der Abteilung für Proteinchemie, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried;

Herrn Dr. X. Baur, dessen stetes Interesse und unermüdliches Engagement den Fortgang dieser Arbeit wesentlich unterstützt haben;

Herrn Dr. H. Aschauer für die Einführung in das experimentelle Arbeiten sowie für die Überlassung von Materialien;

Frau Dr. T. Kleinschmidt, Herrn Dr. J. Pflötschinger, Herrn Dr. W. Steer für die Überlassung von gereinigten Chironomiden-Hämoglobinen;

allen Mitarbeitern, deren Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Inhaltsverzeichnis

0.	Abkürzungen	i
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methode	3
2.1.	Auftrennung der Allergene	3
2.1.1.	Extraktion	3
2.1.1.1.	Imagines	3
2.1.1.2.	Larven	3
2.1.2.	Proteingehaltsbestimmungen der Rohextrakte	4
2.1.3.	Fraktionierung des Larvenextraktes	5
2.1.4.	Gehaltsbestimmungen der Hämoglobinlösungen	5
2.1.5.	Zerlegung von Hämoglobin VI	7
2.1.5.1.	Abspaltung der Häm-Gruppe	7
2.1.5.2.	Spaltung mit BrCN und Isolierung der Peptide	7
2.1.5.3.	Spaltung mit Trypsin und Trennung der Peptidpools	8
2.1.6.	Auswertung der Trennungen	9
2.2.	Kollektiv der untersuchten Personen	10
2.3.	Methoden der Allergiediagnostik	11
2.3.1.	in vivo	11
2.3.1.1.	Anamnese	11
2.3.1.2.	Prick-Test	11
2.3.1.3.	Atemwiderstandsmessung	12
2.3.2.	in vitro	13
2.3.2.1.	Radio-Allergo-Sorbent-Test	13
2.3.2.1.1.	Darstellung der Allergenscheiben	13
2.3.2.1.2.	Assay	15
2.3.2.2.	Radio-Allergo-Sorbent-Inhibitions-Test	16
2.3.2.3.	Phadebas-Radio-Immuno-Sorbent-Test	17
3.	Ergebnisse	19
3.1.	Isolierung der Allergendeterminanten	19
3.1.1.	Homogenisat von Imagines und Larven	19
3.1.1.1.	Charakteristik	19
3.1.1.2.	Allergenaktivität	19
3.1.2.	Fraktionen des Larvenextraktes	20
3.1.2.1.	Charakteristik	20
3.1.2.2.	Allergenaktivität	22
3.1.3.	Hämoglobine im Vergleich	24
3.1.3.1.	Charakteristik	24

3.1.3.2.	Allergenaktivität	24
3.1.3.3.	Inhibierbarkeit	29
3.1.4.	Hämoglobin VI und seine Derivate	30
3.1.4.1.	Bronchialer Provokationstest mit Hämoglobin VI	30
3.1.4.2.	BrCN-Spaltung von Globin VI	30
3.1.4.3.	Vorversuche: Überprüfung der Stabilität der allergen-aktiven Region	32
3.1.4.4.	Tryptische Spaltung von Peptid VI ₃₈₋₁₄₀	33
3.1.4.5.	Allergenaktivität der tryptischen Peptide von VI ₃₈₋₁₄₀	34
3.1.4.6.	RAST-Studien von Hämoglobin VI und seinen Fragmenten	35
3.1.4.7.	Prick-Test mit Hämoglobin VI und seinen Fragmenten	38
3.1.4.8.	Vergleich der Aktivitäten überlappender Peptid- sequenzen	40
3.1.5.	Allergene Verwandtschaft zwischen Imaginesextrakt und Larvenkomponenten	41
3.2.	Screening-Untersuchung von Exponierten	42
3.2.1.	Anamnese, Hauttest, RAST	42
3.2.2.	Arbeitsplatzbezogener Expositionstest	45
4.	Diskussion	48
4.1.	Zur Methodik	48
4.1.1.	Prick	48
4.1.2.	RAST	48
4.1.3.	RAST-Inhibitionstest	48
4.1.4.	Zerlegung von Hämoglobin VI	49
4.1.5.	Isolierung der Fragmente	49
4.1.6.	Vergleich überlappender Peptidsequenzen	49
4.2.	Besprechung der Ergebnisse	50
4.3.	Zur Natur der Allergendeterminanten	54
4.4.	Zur Screening-Untersuchung	55
5.	Zusammenfassung	56
6.	Anhang	59
7.	Literaturverzeichnis	63

D. Abkürzungen

A ₂₈₀	Absorption (-lg T) bei 280 nm
Ag	Antigen
As	Aminosäuren
BrCN	Bromcyan
CNBr	Cyanogenbromid
DEAE	Diäthylaminoäthyl
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient ($M^{-1} \times cm^{-1}$)
GbVI	Globin VI des Hämoglobin VI von <i>Chironomus thummi thummi</i>
HbVI	Hämoglobin VI von <i>Chironomus thummi thummi</i>
VI _{y-z}	Peptid der Aminosäuresequenz y-z von Globin VI
Ig	Immunglobulin
PRICK	Prick-Hauttest
RAST	Radio-Allergo-Sorbent-Test
R _{aw}	Atemwegswiderstand (cm H ₂ O/l/sec)
s	Standardabweichung
TPCK-Trypsin	mit N-Tosyl-L-Phenylalanyl-Chlormethylketon behandeltes Trypsin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
$\bar{x}$	Mittelwert
ϕ	Durchmesser
<	weniger als
>	mehr als



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554009_0094

1. Einleitung

Die Allergie vom Sofort-Typ, Typ I nach Gell und Coombs (38) wird im wesentlichen durch Reagine ausgelöst, die im Serum von sensibilisierten Personen nachgewiesen werden können (82). Die Identifizierung der Reagine als eine bestimmte Klasse der Immunglobuline IgE (50) rechtfertigt die Zugehörigkeit der Allergologie zur Immunologie.

Die Antikörper IgE und IgG erkennen in einigen Fällen die gleiche Antigen determinante (3, 39, 71) beziehungsweise die gleiche antigenaktive Region (40). Dies weist auf strukturelle Gemeinsamkeiten der beiden Immunglobulinklassen hin. Durch Immunisierung von Versuchstieren mit synthetisierten Homopolymeren von Aminosäuren (4, 85, 100), Sacchariden (73) oder Polypeptiden (89) konnten wesentliche Erkenntnisse über Größe, Konformation und optische Konfiguration der Antigen-determinanten gewonnen werden.

Atassi und seinen Mitarbeitern ist es in zehnjähriger intensiver Forschungsarbeit gelungen, die im Hasen- und Ziegen-IgG-System aktive Antigenstruktur der beiden nativen globulären Proteine Wal-Myoglobin (13) und Hühner-Eiweiß-Lysozym (15, 16) aufzuklären.

Die Arbeitsgruppe um Hurrell untersuchte unter ähnlichen Versuchsbedingungen die zum Wal-Myoglobin topologisch analogen Antigen determinanten im Sojabohnen-Leg-Hb (49). Antigene, die eine Allergie vom Sofort-Typ auslösen, heißen atopische Allergene. Die antigen-reaktiven Fraktionen verschiedener Inhalationsallergene, Injektionsallergene und Nahrungsmittelallergene stellen überwiegend Proteine beziehungsweise Glycoproteine dar, mit einem Molekulargewicht zwischen 20.000 und 40.000 Dalton - (zusammenfassender Überblick siehe unter 59, 60, 61, 74).

Von einigen gereinigten allergenen Fraktionen ist die As-Analyse bekannt (28) (zusammenfassender Überblick: 59, 74). Die Primärstruktur von mindestens sechs Allergen-Komponenten liegt vor (31, 42, 44, 62, 68, 76, 91, 92). Gegenstand aktueller Forschung ist das Studium der Allergen-

determinanten von Ragweed AgE (58), AgRa 3 und AgRa 5 (29). Die Allergenstruktur eines Nahrungsmittelallergens, cod allergen M, wesentlich verantwortlich für die Kabeljau-Allergie, konnte in den letzten Jahren weitgehend aufgeklärt werden (1, 33).

Ebenfalls atopische Allergene stellen nicht-stechende Insekten (Diptera) der Familie Chironomidae dar (36, 37, 56), die unter anderem während der Trockenzeit zur Plage werden (35). Die Mücken (Imagines) sind zarte, kleine Tiere, die hauptsächlich in gewässerreichen Gebieten vorkommen. Die Larven der zur Familie Chironomidae gehörenden Sektionen Chironomariae und Tanytarsariae werden auch rote Mückenlarven genannt, die der Aquarienliebhaber als Futter für seine Zierfische verwendet (97). In ihrer Körperflüssigkeit sind Hämoglobine gelöst, die hauptsächlich im Fettkörper synthetisiert werden (103).

Die Aufgabe dieser Arbeit ist es, die für das humane Immunsystem bedeutsamen Allergeneigenschaften einer mitteleuropäischen Zuckmückenart, *Chironomus thummi* (98), Gattung *thummi*, durch in vitro und in vivo Untersuchungen zu studieren. Dabei gehen wir folgendermaßen vor:

1. Auftrennung der nativen Chironomiden (Larven und Imagines) durch Extraktion (Rohextrakt) und Gelchromatographie;
2. Suche nach den antigen-wirksamen Komponenten mittels Antikörperbestimmung und Hauttest bei klinisch sensibilisierten Patienten;
3. Enzymatische und chemische Spaltung allergen-wirksamer Moleküle und Isolierung der einzelnen Fragmente;
4. Identifizierung der allergen-aktiven Regionen eines Allergens durch Radioimmunoassay, Hauttest und Strategie der Überlappenden Peptide;
5. Screening-Untersuchung von exponierten Personen mit Anamnese, Hauttest, Radioimmunoassay sowie mit arbeitsplatzbezogenem Expositionstest.

2. Material und Methode

2.1. Auftrennung der Allergene

2.1.1. Extraktion von Imagines und Larven

2.1.1.1. Imagines

Ausgangsmaterial:

Als Ausgangsmaterial dienten Imagines der Gattung *Chironomus thummi thummi*, die uns freundlicherweise von Dr.H.Tichy, Max-Planck-Institut für Zoologie, Tübingen, zur Verfügung gestellt wurden.

Verarbeitung:

1 g tiefgefrorene Imagines wurde mit 12 ml 0,1 M NaHCO_3 -Puffer pH 8,2 aufgeschlämmt und mit einem Elektroquirl zermalmte. Die Suspension wurde zwei Stunden mit einem Magnetrührer im Eisbad homogenisiert. Zur Entfernung der Zellpartikel zentrifugierten wir dann das Homogenisat (25.000 U/min., 15 min., 4°C). Den Überstand haben wir filtriert, um die bedeckende Lipidschicht zu entfernen. Das Filtrat stellt das Imagines-Rohextrakt dar.

2.1.1.2. Larven

Ausgangsmaterial:

Es fanden tiefgefrorene, rote Larven der Spezies *Chironomus thummi thummi* von ca. 1 cm Länge Verwendung, die sich entsprechend ihrer Größe im 3. beziehungsweise 4. Larvenstadium befanden (97). Die Einheitlichkeit des Materials war durch Discelektrophorese in Polyacrylamidgelen überprüft worden⁺ (20).

Verarbeitung (20):

150 g tiefgefrorene Larven wurden im Mörser grob zerkleinert und anschließend in ca. 250 ml 0,025 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,0, der 0,1% Thiodiglycol als Reduktionsmittel zum Schutz für Methionin enthielt, homogenisiert. Zur Abtrennung der

+ Durchgeführt von der Forschungsgruppe Prof.Braunitzer, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried.

Zellbestandteile zentrifugierten wir das Homogenisat 60 Minuten bei 4°C und 12.000 U/min. Die Fettschicht entfernten wir durch zweimaliges Filtrieren über ein angefeuchtetes Filterpapier. 5 ml des Rohextraktes verarbeiteten wir gleich weiter (2.1.3.); der verbleibende Rest wurde lyophilisiert und später immunologisch untersucht.

2.1.2. Proteingehaltsbestimmungen der Rohextrakte (72)

Den Proteingehalt des Imagines- sowie des Larvenextraktes bestimmten wir mit dem Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz (Merck, Darmstadt) nach Lowry (72).

Prinzip:

Zwei distinkte Reaktionsschritte führen zum Kupferphosphomolybdänsäure- beziehungsweise Kupferphosphowolframsäure-Komplex der Proteine, dessen Absorption bei 750 nm gemessen wurde:

1. Reaktion der Proteine mit den Cu-Ionen in alkalischer Lösung;
2. Reduktion des Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz durch den Cu-Protein-Komplex.

Reagenzien:

- A: 2% Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH;
B: 0,5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ in einer 1%igen Na-Tartrat-Lösung;
C: alkalische Cu-Lösung aus 50 ml Reagenz A und 1 ml Reagenz B;
D: gelöstes Folin-Phenol-Reagenz 1 N in HCl;
E: Serienverdünnungen von Human-Serum-Albumin (Sigma Chemical Co., St.Louis, USA) und 0,9% NaCl mit Konzentrationen von 0,1 bis 1 mg/ml.

Procedere:

Zu 0,2 ml einer Probelösung, die so lange mit physiologischer NaCl verdünnt wurde bis ihr Proteingehalt zwischen 5-100 μg lag, beziehungsweise zu 0,2 ml einer Standard-Verdünnung fügten wir 1 ml Reagenz C und ließen das Gemisch 10 Minuten bei Raumtemperatur reagieren. Jetzt pipettierten wir 0,1 ml Reagenz E dazu. Nach 35minütiger Inkubation in einem Wasserbad von 35°C wurde die Absorption bei 755 nm mit einem Spektral-

photometer (Gilford) gemessen, gegenüber dem Leerwert, der an Stelle der Probe 0,2 ml physiologische NaCl enthielt. Den Proteingehalt der Rohextrakte berechneten wir an Hand der Eichkurve, die wir mit der Standard-Verdünnungsreihe erstellten.

2.1.3. Fraktionierung des Larvenextraktes (20)

Ausgangsmaterial:

Das Larvenextrakt, pH 7,1, dunkelrot, trüb, kaum lichtdurchlässig setzt sich aus Hämolymphe und anderen hochmolekularen Bestandteilen zusammen. Das Hämoglobin macht etwa 90 % des Proteins der Hämolymphe aus (34). Diese enthält mindestens 11 elektrophoretisch nachweisbare Hämoglobine, die unter physiologischen Bedingungen monomer oder dimer sind (20).

Gelchromatographie:

Die Gelfiltration des Larvenextraktes erfolgte auf einer Sephadex G-75 medium Säule (2,6 x 105 cm). 5 ml Larvenextrakt wurden mit Adapter aufgetragen und mit 0,025 M Kaliumphosphatpuffer pH 6, der mit 0,1% Thiodiglycol versetzt war, eluiert, bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 20 ml/h. Wir sammelten Fraktionen von 6,5 ml. Sie sind sowohl bei 280 nm (Trp) als auch bei 540 nm (Häm) diskontinuierlich vermessen worden. Gemäß dem Chromatogramm haben wir die Fraktionen der einzelnen Gipfel vereinigt und jeden Peak alkalisch entsalzt über eine Sephadex G-25 medium Säule mit 0,02 M Ammoniumbicarbonatpuffer, der mit 0,01% Thiodiglycol versetzt war, bei einer Durchflußrate von 200 ml/h. Das entsalzte Eluat der beiden hämoglobinhaltigen Gipfel haben wir jeweils bei 540 nm diskontinuierlich vermessen. Die hämoglobinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und nach der Titerbestimmung (2.1.3.) lyophilisiert.

2.1.4. Gehaltsbestimmungen der Hämoglobinlösungen

Ausgangsmaterial:

Mit dem Fraktionsvolumen des ersten hämoglobinhaltigen Gipfels wurden die dimeren Hämoglobine mit einem Molekulargewicht von 32.000 Dalton eluiert (20). Sie werden durch nicht-kovalente

Kräfte zusammengehalten, sind im pH-Bereich von 5,7 bis 7,2 stabil und stehen bei $\text{pH} > 7,2$ im Gleichgewicht mit ihren monomeren Formen. Die Dissoziation ist bei $\text{pH} 9,8$ vollständig (19).

Der zweite hämoglobinhaltige Gipfel enthält die Monomere mit einem Molekulargewicht von 16.000 Dalton (20).

Durchführung:

Die oxidierte, mit Cyanidionen ligandierte Hämgruppe - Metcyanform des Hämeisens - zeigt bei 540 nm ein breites Absorptionsmaximum. Die Vermessung dieser Bande wird zur Gehaltsbestimmung von Hämoglobinlösungen eingesetzt (26). Zur Titerbestimmung wurden jeweils 0,2 ml der Hämoglobinlösung mit "Transformationslösung" (0,16% K_3FeCN_6 + 0,16% KCN in H_2O bidest.) auf 4 ml aufgefüllt.

Nach 15 Minuten bestimmten wir die Absorption der Probelösung gegen den Leerwert (Transformationslösung) bei 540 nm (Zeiss Spektralphotometer PM 6).

Die Hämoglobinkonzentration berechneten wir nach folgender Gleichung:

$$c_{\text{Hb}} = \frac{A_{540} \times F}{\epsilon_{540} \times s}$$

$$C_{\text{Hb}} = c_{\text{Hb}} \times M_{\text{Hb}}$$

c_{Hb} : molare Hämoglobinkonzentration (M)

A_{540} : Absorption bei 540 nm (-lg T)

ϵ_{540} : molarer Extinktionskoeffizient ($\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)
hier: = $22,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (empirisch)

s : Schichtdicke der Küvette (cm) (hier: 1 cm)

F : Verdünnungsfaktor (hier: 20)

C_{Hb} : Hämoglobinkonzentration (g/l)

M_{Hb} : Molekulargewicht des Hämoglobins

2.1.5. Zerlegung von Hämoglobin VI

Ausgangsmaterial:

Das Hämoglobin VI, eines der dimeren Larvenhämoglobine, hat ein Molekulargewicht von 32.411 Dalton. Die beiden Globinketten sind jeweils aus 147 Aminosäuren zusammengesetzt, die sich in einer Position unterscheiden (6).

2.1.5.1. Abspaltung der Häm-Gruppe (96)

Die prosthetische Gruppe wurde mit Äthylmethylketon entfernt, da diese Methode zu keiner Denaturierung des Globins führt (7). 300 mg Hämoglobin VI + wurden in 100 ml destilliertem Wasser gelöst. Mit 0,1 N HCl stellten wir die Lösung auf pH 2 ein. Häm wurde je zweimal mit 200 ml Äthylmethylketon im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde am Rotationsverdampfer mehrmals eingeengt, wobei das gelöste Äthylmethylketon abdestilliert. Die Globinlösung lyophilisierten wir anschließend.

2.1.5.2. Spaltung mit BrCN (41) und Isolierung der Peptide

Theorie:

Bei der Spaltung mit BrCN wird Methionin über mehrere Zwischenstufen in Homoserinlacton überführt. Die Spaltung verläuft C-terminal zu Homoserinlacton. Wir wählten die BrCN-Spaltung, da Globin VI nur drei Met enthält, weshalb wir vier Bruchstücke erwarten können, wovon zwei Peptide lange Partialsequenzen enthalten, die leicht zu isolieren sind. Die beiden kleinen Peptide, ein Tetra- und ein Dipeptid, sind nach Literaturangaben (13, 16) zu klein, um allergen-aktiv zu sein. Sie sollen trotzdem als Pool allergologisch studiert werden.

Ausführung:

200 mg Globin VI wurden in 7 ml konzentrierter Ameisensäure gelöst und langsam mit 3 ml destilliertem Wasser verdünnt, so daß die Lösung 70%ig an Ameisensäure wurde. 200 mg BrCN wurden zugesetzt und die Reaktion 6 h bei Raumtemperatur im Dunkeln durchgeführt. Anschließend verdünnten wir auf das zehnfache Volumen mit 90 ml destilliertem Wasser. Die Ameisen-
+ isoliert von Dr.H.Aschauer

säure destillierten wir mit dem Rotationsverdampfer teilweise ab. Das eingeengte Volumen wurde lyophilisiert, wobei der Rest der noch vorhandenen Ameisensäure verdampft.

Isolierung der BrCN-Peptide

Im Hinblick auf die beiden größeren Peptide wurden die Spaltprodukte mit Biogel P-30 (100 - 200 mesh, Fa. Bio-Rad, USA) auf einer 2,5 x 110 cm Säule chromatographiert. Der verwendete Puffer von pH 8,5 besteht aus 6 M Guanidinhydrochlorid und 0,1 M Trispuffer. 200 mg des lyophilisierten, gespaltenen Globins, gelöst in 5 ml Elutionspuffer wurde mit Adapter auf der Säule aufgetragen. Die Chromatographie wurde bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 20 ml/h durchgeführt. Die 130 gesammelten Fraktionen von jeweils 5 ml haben wir diskontinuierlich bei 280 nm vermessen. Die proteinhaltigen Fraktionen der einzelnen Peptide wurden alkalisch entsalzt mit 0,02 M Ammoniumbicarbonatpuffer + 0,01% Thiodiglycol auf einer Sephadex G-25 medium Säule (2,5 x 110 cm). Das Eluat wurde bei 280 nm vermessen. Die entsprechenden Fraktionen haben wir vereinigt und lyophilisiert.

Die Fraktionen der kleinen Peptide, vereinigt zum Peptidpool, wurden sauer entsalzt mit 0,5 N Essigsäure auf einer Biogel P2 (100 - 200 mesh, Fa. Bio-Rad, USA) Säule (2,5 x 100 cm) bei einem Durchfluß von 60 ml/h. Das Eluat haben wir gegen 0,5 N Essigsäure diskontinuierlich vermessen. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert.

2.1.5.3. Spaltung mit Trypsin (45) und Isolierung der Peptidpools

Theorie:

Trypsin reagiert mit den carboxyständigen Peptidbindungen von Arginin und Lysin. Die Bindung Lys - Pro wird nicht gespalten. Bei Hydrolyse an jeder potentiellen Spaltstelle des größten BrCN-Peptids VI₃₈₋₁₄₀ erhalten wir 10 Peptide mit Partialsequenzen zwischen zwei und 26 Aminosäuren. Die Proteinpools gleich langer Peptide sollen getrennt und immunologisch untersucht werden.

Ausführung:

270 mg Peptid VI₃₈₋₁₄₀ wurden mit 5,4 mg TRTPCK Trypsin (290 U/mg, 83% Protein, Fa.Worthington Bioch.Corp.) eingewogen (Protein : Trypsin = 50 : 1) und in 26 ml destilliertem Wasser suspendiert. Zum Ansatz haben wir CaCl_2 bis zu einer Konzentration von 0,5 mM zugefügt (hier: 2 Kristalle, circa 0,14 mg). Die Lösung stellten wir mit konzentriertem Ammoniak (ca. 1,3 ml) auf pH 11 ein. In diesem stark alkalischen Milieu (bessere Spaltung an Arginin) wurde 2 h unter Rühren bei Raumtemperatur gespalten. Jetzt setzten wir erneut 5,4 mg Enzym zu. Den pH-Wert stellten wir mit 1 N HCl auf 8,6 ein. In diesem Milieu (bessere Spaltung an Lysin) wurden weitere 2 h bei Raumtemperatur gespalten sowie 1 h bei 37°C im Wasserbad, jeweils unter Rühren. Die Lösung wurde dann lyophilisiert, wobei Ammoniak und Salzsäure verdampfen. Das Lyophilisat wurde immunologisch untersucht und dann weiter aufgetrennt.

Isolierung der Peptidpools

Es wurde 160 mg des Lyophilisates in 7 ml Chromatographiepuffer, 0,1 M Tris/HCl in 6 M Guanidinhydrochlorid pH 8,5 gelöst und auf einer 2,5 x 110 cm Säule mit Biogel P-30 (100 - 200 mesh, Fa.Bio-Rad, USA) chromatographiert. Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 20 ml/h sammelten wir 140 Fraktionen von jeweils 5 ml. Das Eluat haben wir bei 280 nm (Trp) diskontinuierlich vermessen. Die entsprechenden Fraktionen wurden zu drei Peptidpools vereinigt, die auf einer Biogel P-2 (200 - 400 mesh, Fa.Bio-Rad, USA) Säule (2,5 x 90 cm) entsalzt und anschließend lyophilisiert wurden.

2.1.6. Auswertung der Trennungen

Die Eluate wurden mit einem Fraktionssammler (Fa.Isco Instrumentation Co., Lincoln, Nebraska) in Fraktionen mit konstantem Volumen gesammelt.

Die Trennsäulen wurden mit einer Pumpe (LKB 12.000 Varioperpex, Peristaltic Pump) betrieben.

Die Eluate haben wir bei 230, 280 bzw. 540 nm diskontinuierlich vermessen mit einer automatischen "Off-line" Meßanord-

nung (5).

2.2. Kollektiv der untersuchten Personen

Patientenkollektiv

Wir untersuchten 94 gegenüber roten Mückenlarven exponierte Personen zwischen 25 und 50 Jahren, die entweder täglich oder einmal wöchentlich in einem Zeitraum von vier Monaten bis zu zwölf Jahren mit Chironomidenlarven Kontakt hatten.

16 Untersuchte litten an einer anderen Allergie. Eine Person wurde zur Zeit der Untersuchung wegen einer Pollenallergie hypsensibilisiert.

63 Patienten waren Beschäftigte eines Fischfutterwerkes, in welchem unter anderem gefriergetrocknete rote Mückenlarven verarbeitet beziehungsweise abgefüllt wurden.

27 der Untersuchten waren Aquarianer, die Chironomidenlarven gefriergetrocknet sowie gefroren als Futter für ihre Zierfische verwendeten. Sie hatten sich auf eine Zeitungsannonce bezüglich Atemwegserkrankung durch rote Mückenlarven bei uns gemeldet.

Vier der Kontaminierten gehörten einer Forschungsgruppe an, die sich wissenschaftlich mit *Chironomus thummi thummi* beschäftigte.

Studiengruppe

Die Untersuchungsgruppe, an der die Aktivität der einzelnen Allergenkomponenten zunächst studiert werden sollte (als zusätzliche Bestätigung diente die Screening-Untersuchung bei Sensibilisierten), bestand aus 12 an einer Chironomidenallergie leidenden Personen, die in Anamnese, Hauttest und RAST übereinstimmend positive Befunde zeigen. Es handelte sich um zufällig ausgewählte Personen unterschiedlicher Sensibilisierungsgrade, die den drei oben erwähnten Beschäftigungsgruppen angehörten, wie folgt: 5 Arbeiter des Fischfutterwerkes, 4 Aquarianer und 3 Forscher.

Kontrollkollektiv

Um die Manipulation unserer Testergebnisse durch unspezifische Einflüsse kontrollieren zu können, untersuchten wir zum Ver-

gleich ein Kontrollkollektiv, das sich aus neun gegen Chironomus thummi thummi nicht-exponierten und nicht-sensibilisierten Personen zusammensetzte. Diese Voraussetzung wurde durch Anamnese, Hauttest und RAST überprüft.

2.3. Methoden der Allergiediagnostik

2.3.1. in vivo:

2.3.1.1. Anamnese

Die Anamnesen der Aquarianer erhoben wir durch briefliche, die der Forschungsgruppe durch mündliche Exploration. Zur Screening-Untersuchung der Beschäftigten des Fischfutterwerkes wurde ein Fragebogen (Abb.6.1. Anhang) erstellt, der unter anderem Fragen nach persönlichen Daten, Expositionszeit, Expositionshäufigkeit als auch die Symptome der Typ I Allergie anführt. Der ausgefüllte Fragebogen wurde mit dem Patienten diskutiert.

2.3.1.2. Prick-Test

Absicht:

Der Prick-Test, ein direkter Hauttest, wurde zur Überprüfung der biologischen Aktivität der Allergene als auch im Rahmen der Screening-Untersuchung zur Allergiediagnostik eingesetzt.

Testlösungen

Jeweils 1 mg Lyophilisat wurde in 1 ml NaHCO_3 -Puffer pH 8,2 aufgelöst und anschließend mit einer 0,9%igen NaCl-Lösung, der 0,4% Phenol zugesetzt war, bis zur gewünschten Konzentration verdünnt.

Das Imagines-Extrakt, Proteingehalt (4 mg/ml), wurde mit der Verdünnungslösung (0,9% NaCl - 0,4% Phenol) 1 : 10 bzw. 1 : 100 verdünnt.

Die Proteinkonzentrationen der Standard-Testlösungen betrugen:

- Imagines-Extrakt-Lösung: 0,4 mg/ml
- Larven-Extrakt-Lösung: 0,5 mg/ml
- Hämoglobin-, Globin-, Peptid-Lösungen: 0,1 mg/ml.

Die Lösungen mit Nicht-Hämoglobin-Fractionen des Larven-Extraktes (Peak A und Peak D) enthalten eine Lyophilisat-

konzentration von 0,1 mg/ml.

Bei Verdacht auf hochgradige Sensibilisierung wurden die Konzentrationen der Testlösungen um einen Faktor von 1/10 bzw. 1/100 weiterverdünnt. Die Allergenlösungen wurden zunächst am Kontrollkollektiv getestet, um einen unspezifischen Reiz auszuschließen.

Ausführung:

Wir wendeten den modifizierten Prick-Test an (80). Die Allergenlösungen wurden mit Hilfe einer Tropfpipette auf der Volarseite des Unterarmes, im Abstand von ca. 4 cm, aufgebracht. Die Allergene führten wir folgendermaßen in die Epidermis ein: Die Spitze einer Nadel (Größe 19) wurde durch den Allergentropfen unter einem spitzen Winkel in die Haut geschoben und dann leicht angehoben.

Eine Kontrolltestung mit Allergenlösungsmittel und Histamin (1,0 mg/ml) wurde durchgeführt, um die individuelle Hautreagibilität berücksichtigen zu können. Für jede Testlösung benutzten wir eine neue Nadel.

Auswertung:

Wir lasen die Reizantwort nach 20 Minuten ab, wie von der Northern Society of Allergology empfohlen.

Der mittlere Durchmesser der Quaddel wurde gemessen.

Der Test gilt als positiv, wenn der Quaddeldurchmesser bei einer Allergenkonzentration von 0,1 mg/ml mehr als 2 mm größer ist als der Durchmesser der Lösungsmittelquaddel.

Wurden mehrfache Verdünnungen eingesetzt, so transformierten wir den Durchmesser auf die Konzentration der Standard-Testlösungen (s. 2.3.1.2. Testlösungen), basierend auf der Erfahrung an mehreren Allergikern, daß der Quaddeldurchmesser pro zehnfacher Verdünnung der Allergenlösung um circa 50% abnimmt.

2.3.1.3. Atemwiderstandsmessung

Am Arbeitsplatz wurden im Rahmen der Screening-Untersuchung Atemwiderstandsmessungen bei zehn Personen sowohl vor Expositionsbeginn als auch nach dreistündiger Arbeit mit roten Mückenlarven (wiegen, abfüllen) durchgeführt.

Hierbei wurde das auf dem oszillatorischen Meßprinzip beruhende Gerät Siregnost FD 5 (Siemens) verwendet.

In einem Fall erfolgte die inhalative Provokation einer sensibilisierten Person im Lungenfunktionslabor der Pulmonologischen Abteilung, Medizinische Klinik I, Klinikum Großhadern. Es sollte die biologische Aktivität eines gereinigten Allergens überprüft werden.

Zur Vernebelung eines gereinigten Allergenextraktes, Hämoglobin VI, 1,0 µg/ml, benutzten wir einen Ringdüsenvernebler (Fa. Heyer, Modell AV3/H). Als Kontrolllösung diente 1,0 ml des Allergenverdünnungsmittels 0,9% NaCl mit 0,4% Phenol.

Die Vermessung erfolgte mit dem Ganzkörperplethysmographen (Fa. Jaeger) vor und nach Applikation des Lösungsmittels, sofort und insgesamt zehnmal in Abständen von 10 - 60 Minuten bis 4 h nach Allergeninhalation.

2.3.2. in vitro

2.3.2.1. Radio-Allergo-Sorbent-Test (RAST) (18, 27, 101, 102)

Absicht:

Der RAST wurde sowohl zur Prüfung der Allergenaktivität der Lyophilisate als auch zur Screening-Untersuchung von Chironomus-Exponierten eingesetzt.

Prinzip:

Es handelt sich um eine Sandwich-Technik. Sie benutzt an Cellulose-Discs kovalent gekoppelte Allergene, um die spezifischen IgE des Serums zu binden und dieselben nun in einem zweiten Schritt durch radioaktiv markierte Anti-IgE-Antikörper nachzuweisen. Die gebundene Radioaktivität ist ein direktes Maß für die im Patientenserum vorhandenen allergenspezifischen IgE.

2.3.2.1.1. Darstellung der Allergenscheiben

A. Cyanogen-Bromid-Aktivierung von Cellulose-Discs

Prinzip:

Zur Aktivierung der Polysaccharide wird das Polymer für einige Minuten bei pH 10,5 mit CNBr behandelt.



Ausführung:

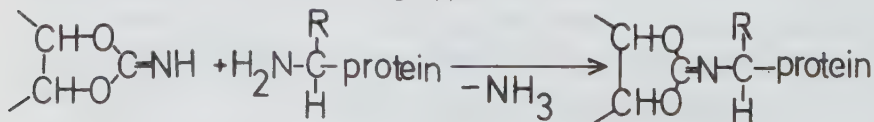
Papierscheiben mit einem Durchmesser von 6 mm (ca. 2 mg) haben wir aus Filterpapier (Munktell 00) ausgestanzt. Die Discs wurden mit CNBr wie folgt aktiviert:

Man läßt 20 g Scheiben 3 min. lang in destilliertem Wasser quellen und gibt dann die Discs zu 600 ml CNBr-Lösung (20 g CNBr in 600 ml H₂O dest.). Der Wert der Lösung wurde mit 1 M NaOH auf 10,5 eingestellt und 10 min. lang beibehalten. Nach dem Absaugen der Flüssigkeit haben wir die Discs in 500 ml 0,005 M NaHCO₃ 2 min. gewaschen. Diesen Waschvorgang wiederholten wir zwölfmal. Die Discs wurden anschließend mit 500 ml destilliertem Wasser und dann Schritt für Schritt mit jeweils 500 ml 25%, 50%, 75% und schließlich 100% Aceton zwei- bzw. mit letzterem viermal gewaschen. Indem das Aceton bei Raumtemperatur verdampfte, wurden die Discs getrocknet. Die aktivierten Scheiben wurden bei -20°C aufbewahrt bis zur Kopplung.

B. Allergenkopplung an aktivierte Cellulosescheiben

Prinzip:

In neutraler oder leicht alkalischer Lösung reagiert die aktive Carbohydratgruppe mit Aminogruppen:



Vorversuche:

Um eine optimale Beschickung der Scheiben zu gewährleisten, wurden Kopplungskonzentration und Kopplungs-pH an Hand von Eichkur-

ven gewählt. Die Dosis-Antwortkurve bei ansteigender Konzentration der Kopplungssuspension (2×10^{-3} mg/ml; 2×10^{-2} mg/ml; 2×10^{-1} mg/ml; 2 mg/ml; 20 mg/ml) und pH 8,2 zeigt den maximalen Effekt bei 2×10^{-1} mg/ml. Bei Variation des Kopplungs-pH (pH 5/6/7/8,2/10/11) und bei einer Antigenkonzentration von 2×10^{-1} mg/ml erwies sich die leicht alkalische Lösung mit pH 8,2 am günstigsten.

Ausführung:

1 mg der lyophilisierten Substanzen wurde in 5 ml 0,1 M Natriumhydrogencarbonatpuffer pH 8,2 gelöst und mit 125 mg Discs (ca. 60 Stück) 4 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Das Images-extrakt, 7 ml, pH 9,1, haben wir an 160 mg Scheiben auf gleiche Weise gekoppelt. Nach Absaugen der Inkubationsflüssigkeit und Auswaschen mit 0,5 M NaHCO_3 -Puffer pH 8,4 wurden die noch reaktiven Carbohydratgruppen abgesättigt, weshalb 0,05 M Äthanolamin in 0,1 M NaHCO_3 -Puffer, 12 h bei 4°C einwirken mußte. Die Discs wurden erneut ausgewaschen, zweimal mit 0,5 M NaHCO_3 -Puffer pH 8,4, einmal mit 0,1 M Na-Acetat-Puffer pH 5 und anschließend in letzterem 30 min. inkubiert. Nach Spülen in Tweenpuffer pH 7,4 (Phadebas-RAST-Reagenz, Deutsche Pharmacia GmbH) haben wir die Scheiben in diesem Puffer bei 4°C aufbewahrt. Die Reproduzierbarkeit der Kopplung, überprüft an zwei Chargen, war $\pm 14\%$.

2.3.2.1.2. Assay

Procedere:

Die Seren waren in kleinen Fraktionen bis zum Test bei -20°C tiefgefroren. Sie wurden je nach Grad der zu erwartenden Sensibilisierung (beurteilt nach der in vivo-Untersuchung bzw. in RAST-Vorversuchen) verdünnt mit 0,9% NaCl-Lösung bzw. unverdünnt eingesetzt, so daß die zu bestimmende IgE-Konzentration in den linearen Bereich der Standard-Eichkurve (mit Hilfe der Standardseren, Deutsche Pharmacia GmbH) fällt. Den Test haben wir entsprechend den in der Literatur gemachten Angaben (18, 101) ausgeführt. Je eine Allergenscheibe wurde 3 h mit 50 μl Patientenserum inkubiert, anschließend das Serum abgesaugt, die

Scheiben mit 0,9% NaCl gewaschen und mit ^{125}J markiertem Anti-IgE (Deutsche Pharmacia GmbH) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 h wurden die überschüssigen ^{125}J -Anti-IgE mit 0,9% NaCl gewaschen und die verbleibende Radioaktivität in einem Gammacounter (Fa. Berthold, München) als Counts/ 2 min. gemessen.

Auswertung:

Die gebundene Radioaktivität wurde mit Hilfe der Eichkurve des kommerziell erhältlichen Phadebas-RAST-Referenzsystems (Deutsche Pharmacia GmbH) in U/ml umgerechnet. Die RAST-Werte der verdünnten Seren wurden auf unverdünnte Seren transformiert.

Die angegebenen Werte in U/ml sind Mittelwerte von Doppel- bzw. Dreifachbestimmungen.

Die Reproduzierbarkeit des Assays lag bei $\pm 11\%$.

Seren, die zu RAST-Werten $>0,35$ U/ml führen, enthalten laut Referenzsystem allergenspezifische IgE. In der Screening-Untersuchung wurden diese Seren als RAST-positiv bewertet.

Im Rahmen der Allergenisolierung galt eine Substanz dann als nicht allergen, wenn mit Hilfe von 10 Seren mittelgradig bis stark sensibilisierter Personen durchwegs RAST-Werte von $<0,35$ U/ml erreicht werden. Die Allergenaktivität einer Partialsequenz wurde als grenzwertig betrachtet, wenn der RAST-Wert zwischen 0,35 und 0,8 U/ml liegt und weniger als 2% der Globinaktivität beträgt; denn die Peptide sind bis zu 2% verunreinigt (7).

2.3.2.2. Radio-Allergo-Sorbent-Inhibitions-RAST

Prinzip:

Das Disc-gekoppelte Allergen reagiert während der RAST-Prozedur mit den allergenspezifischen IgE des Serums. Werden letztere durch ein im Serum gelöstes Allergen teilweise bzw. vollständig gebunden, weist der RAST diese Antikörper nur noch zum Teil beziehungsweise nicht mehr nach. Die jeweilige Inhibition ergibt sich in % Verringerung des Normal-RAST. Diese Inhibitionsrate läßt sich nach folgender Gleichung berechnen:

$$\% \text{ des Normal-RAST} = \frac{a - b}{a - l} \times 100$$

a, b, l sind RAST-Werte (U/ml), die für jeweils ein bestimmtes Allergen gewonnen wurden.

a: Vergleichs-RAST-Wert

b: Inhibitions-RAST-Wert

l: maximaler Leerwert = mittlerer Leerwert des Kontrollkollektivs + Standardabweichung ($\bar{x} + s$)

Ausführung:

Das Serum wurde mit der auf ihre Inhibierungsfähigkeit zu testenden Antigenlösung vermischt und nach 15 h Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler im normalen RAST-Verfahren angewandt (3.2.1.2.). Wir verwendeten Serum einer gegenüber *Chironomus thummi thummi* mittelgradig sensibilisierten Person mit positiver Anamnese, positivem Prick und positivem RAST.

Das Serum wurde wie folgt vorbereitet:

Inhibitions-Serum (pH 8) bei lyophilisierten Allergenen:

10% Serum + 50% 0,1 M K_3PO_4 -Puffer pH 7,2 + 40% Allergenlösung. Die Allergenlösung bestand aus 0,1 M $NaHCO_3$ -Puffer pH 8,2, in dem die Lyophilisate in unterschiedlicher Konzentration gelöst wurden.

Inhibitions-Serum (pH 8,4) bei Imaginesextrakt:

10% Serum + 40% 0,1 M K_3PO_4 pH 7,2 + 50% Imaginesextrakt pH 9,1.

Vergleichs-Serum pH 8:

10% Serum + 50% 0,1 M K_3PO_4 pH 7,2 + 40% 0,1 M $NaHCO_3$ pH 8,2. Als Bezugsgröße für die Inhibierbarkeit galt die Selbstinhibierungsrate der Antigene, die sich ergibt, wenn zur Inhibition gleiche Antigene wie bei der anschließenden RAST-Messung benutzt werden.

2.3.2.3. Phadebas-Radio-Immuno-Sorbent-Test (27)

Die quantitative Bestimmung der Gesamt-IgE-Antikörper im Serum nachweislich Chironomiden-Sensibilisierter erfolgte mit dem kommerziell erwerblichen Phadebas-IgE-PRIST (Deut-

sche Pharmacia GmbH) entsprechend der Anleitung des Herstellers.

Prinzip:

Es handelt sich um einen direkten Radioimmunoassay mit Papierscheiben als feste Phase. Das Anti-IgE ist an diese Discs kovalent gekoppelt und reagiert in der ersten Inkubation mit dem IgE der Patientenprobe. Nach einem Waschvorgang werden radioaktiv markierte IgE-Antikörper zugesetzt, die mit dem gebundenen IgE einen Komplex bilden. Gebundene und freie Radioaktivität werden durch Auswaschen der Scheiben voneinander getrennt. Die Radioaktivität des Komplexes wird anschließend in einem Gammazähler gemessen. Die gebundene Radioaktivität ist direkt proportional der IgE-Konzentration in der unbekannten Probe.

Ausführung:

Die technische Ausführung erfolgte laut Testprotokoll der Deutschen Pharmacia GmbH, Freiburg. Die Ergebnisse sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

100 µl Standardlösung bekannter IgE-Konzentration bzw. 100 µl der zu untersuchenden Serumverdünnung wurden auf die Anti-IgE-Discs pipettiert. Nach 3 h Inkubation haben wir die Scheiben mit 0,9% NaCl-Lösung ausgewaschen. Anschließend wurden sie mit jeweils 100 µl der ^{125}J -Anti-IgE-Lösung für 15 h inkubiert. Dann wurden die überschüssigen ^{125}J -Anti-IgE ausgewaschen und die gebundene Radioaktivität in einem Gamma-counter (Fa. Berthold, München) für zwei Minuten gemessen.

Auswertung:

Die Zählraten der unbekannten Proben wurden, wie die Zählraten der Standardseren, nach Subtraktion des Nulleffektes (Zählrate eines leeren Röhrchens) in Prozent der Totalaktivität umgerechnet. Anhand der Standardkurve für die Eichseren wurde die IgE-Konzentration in U/ml für jede Probe abgelesen und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Die Eichkurve umfaßt den Bereich 0,5 - 100 U/ml IgE. Der PRIST-Standard ist gegen den WHO-IgE-Substandard 69/204 kalibriert.

1 Unit dieses Standards enthält 2,4 ng IgE (54). Aus einer PRIST-Studie an 175 Normalpersonen ergeben sich folgende Richtwerte (77):

geometrisches Mittel : 14 U/ml
obere 1s-Bereichsgrenze: 41 U/ml
obere 2s-Bereichsgrenze: 122 U/ml.

3. Ergebnisse

3.1. Isolierung der Allergendeterminanten

3.1.1. Homogenisat von Imagines und Larven

3.1.1.1. Charakteristik

Die Extraktion von 1 g Imagines mit 12 ml NaHCO_3 -Puffer führt zu 7 ml Extrakt pH 9,1 mit einer Proteinkonzentration von 4 mg/ml. Die Flüssigkeit ist grün gefärbt. Das Larvenextrakt, 35 ml, pH 7,1 von 150 g Larven mit 250 ml Kaliumphosphatpuffer erscheint dunkelrot. Die Proteinkonzentration beträgt 5 mg/ml.

3.1.1.2. Allergenaktivität

Beide Extrakte erweisen sich sowohl im PRICK-Test als auch im RAST allergen-aktiv (Tabelle 3.1.1.2.).

Vergleicht man die IgE-Bindekapazität beider Extrakte im RAST unter Berücksichtigung der Assay-Fehlerstreuung von $\pm 11\%$, so verhält sich das Imaginesextrakt in 5 von 12 Seren aktiver, während mit dem Larvenextrakt in 5 anderen Seren der Studiengruppe höhere RAST-Resultate erzielt werden. Der PRICK-Test, mit beiden Extrakten, die sich in ihrer Gesamtproteinkonzentration geringfügig unterscheiden (s.2.3.1.2.), bei acht Personen durchgeführt, zeigt keine wesentlichen Reaktivitätsunterschiede zwischen beiden Substanzen.

Tab.3.1.1.2. Allergenaktivität der Roh-Extrakte von Imagines und Larven bei sensibilisierten Personen.

Patient ^{a)}	RAST U/ml		PRICK ϕ in mm			
	Imagines	Larven	Imagines ^{b)}	Larven ^{c)}	Hist ^{d)}	K.lsg. ^{e)}
G.K.	44,1	41,0	18	18	7	0
B.H.	1,6	1,6	nb	10	5	0
W.H.	1,2	0,7	nb	nb	nb	nb
F.J.	40,8	30,2	6	10	3	0
T.F.	725,0	1328,0	10PS	8	3	0
J.I.	394,8	698,0	15PS	14	7	0
P.K.	4,5	5,5	10	10	6	0
Z.K.	63,4	92,4	12	nb	6	0
S.W.	79,5	43,0	nb	20	5	0
W.K.	5,4	7,0	8	10	9	0
M.K.	157,0	126,0	6	8	4	0
M.A.	2,8	0,7	5	6	5	0
Kontr. ^{a)}	0,12	0,15	0	0	4,8	0
$\bar{x}$ n=9						
s	$\pm 0,03$	$\pm 0,18$			$\pm 1,3$	

a) Patientenkollektiv, Kontrollkollektiv (s.2.2.)

b) Imagines-Extrakt: Gesamt-Proteinkonzentration: 0,4 mg/ml

c) Larven-Extrakt: Gesamt-Proteinkonzentration: 0,5 mg/ml

d) Histamin: 1,0 mg/ml

e) Kontrolllösung: 0,9% NaCl - 0,4% Phenol

PS Pseudopodien

nb nicht bestimmt

3.1.2. Fraktionen des Larvenextraktes

3.1.2.1. Charakteristik

Die Auftrennung des Larvenextraktes an Sephadex G-75 ergibt laut Chromatogramm bei Absorption der aromatischen Aminosäuren (Abb.3.1.2.a 280 nm) die vier Gipfel A, B, C, D, die mit Hilfe der hämoglobinspezifischen Vermessung (Abb.3.1.2.a 540nm) analog (20) zugeordnet wurden wie folgt:

Peak A: Fraktionen 29 - 35 : Vorpeak

Peak B: Fraktionen 48 - 55 : dimere Hämoglobine

Peak C: Fraktionen 60 - 65 : monomere Hämoglobine

Peak D: Fraktionen 90 - 100 : Salzpeak

Das entsalzte Eluat beträgt:

Peak A: 39,0 ml

Peak C: 32,5 ml

Peak B: 45,5 ml

Peak D: 65,0 ml

Abb.3.1.2.a Gelchromatographie des Larvenextraktes

Gel: Sephadex G-75 medium

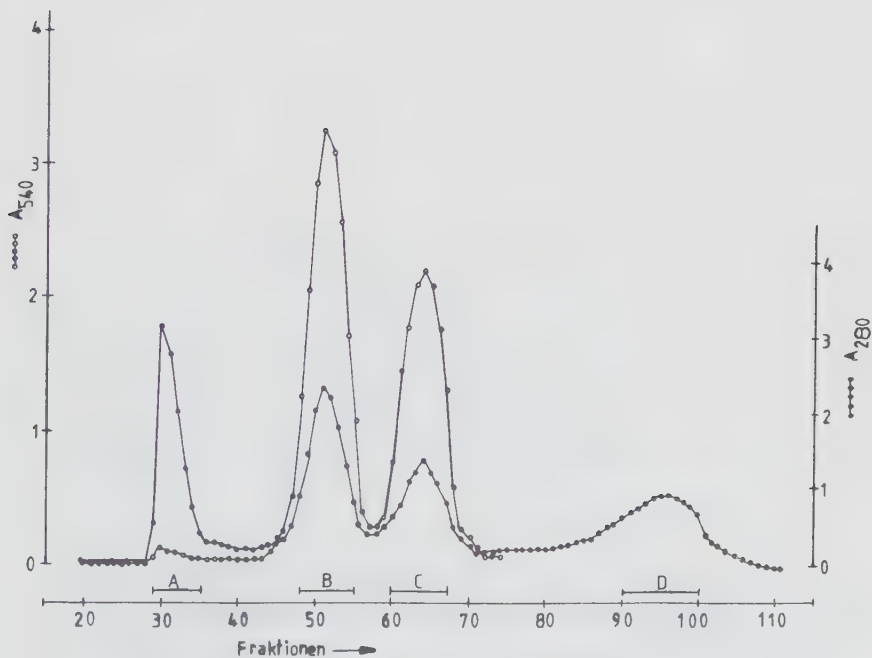
Säule: 2,6 x 105 cm

Puffer: 0,025 M Kaliumphosphat pH 6

mit 0,1% Thiodiglykol

Durchfluß: 20 ml/h

Fraktionsvolumen: 6,5 ml



Das Lyophilisat wiegt:

Peak A : 20 mg

Peak B : 58 mg

Peak C : 22 mg

Peak D : 6 mg

Die Berechnung des Hämoglobingehaltes der entsalzten hämoglobinhaltigen Fraktionen ergibt:

Peak B : 56,9 mg

Peak C : 17,6 mg

Peak A enthält die Substanzen des Larvenextraktes, die im Ausschlufvolumen des Gels eluiert werden. Nach ihrem Molekulargewicht, 240.000 Dalton, handelt es sich um hochmolekulare Proteine- und Zuckeranteile (20). Die Lösung ist weißgelblich.

Peak D, der Salzpeak der Larvenextraktfraktionierung, besteht aus einer weißlichen, klaren Flüssigkeit, die sich in ein weißes, stark hygroskopisches Lyophilisat überführen läßt, das fest am Glas haftet.

Das Elutionsvolumen des Peak B enthält die dimeren Hämoglobine mit einem Molekulargewicht von 32.000 Dalton (20). Bei einem Kopplungs-pH von 8,2 (s.2.3.2.1.1.) stehen sie jedoch mit ihren monomeren Formen im Gleichgewicht (s.2.1.3.), weshalb die Quartärstruktur bei den immunologischen Studien (s.u.) nicht berücksichtigt werden konnte.

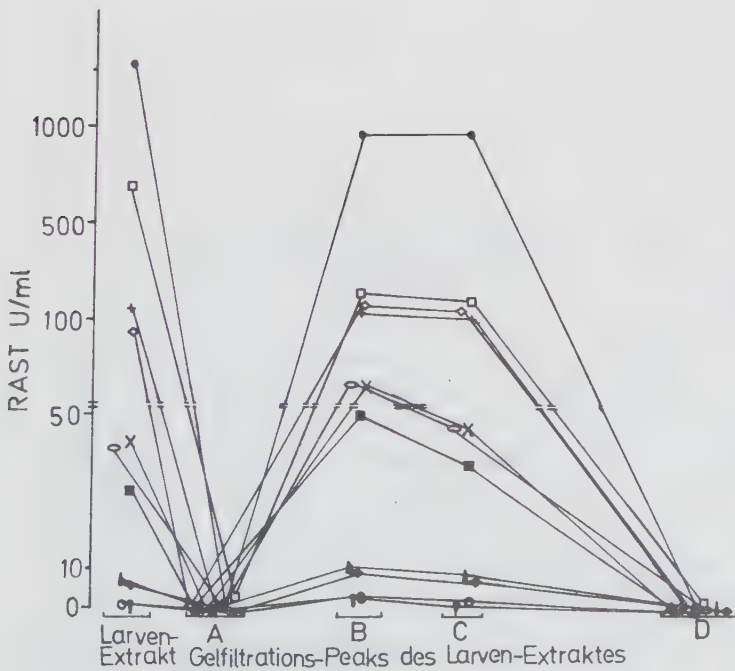
Die Fraktionen von Peak C enthalten die monomeren Hämoglobine mit einem Molekulargewicht von 16.000 Dalton (20).

3.1.2.2. Allergenaktivität

Das allergene Verhalten der vier Fraktionen des Larvenextraktes wurde mit RAST (Abb.3.1.2.b) und teilweise auch mit PRICK untersucht.

Die hämoglobinhaltigen Komponenten, Peak B und C zeigen sich mit allen 11 Allergikerseren unserer Studiengruppe eindeutig allergen-aktiv, während mit den Kontrollseren keine Reaktion nachzuweisen ist. Die dimeren Hämoglobine erzielten in acht Patientenseren höhere RAST-Resultate als die monomeren, während nur eine Monomerscheibe die meisten spezifischen IgE bindet.

Abb.3.1.2.b Allergenaktivitäten des Larvenextraktes und seiner Gelfiltrations-Peaks (A, B, C, D) im RAST mit 11 Seren unserer Studiengruppe (s.2.2.). Die unterschiedlichen Symbole stehen für die verschiedenen Patientenseren.



Die RAST-Werte für Peak A sind siebenmal, die für Peak D achtmal unter 0,35 U/ml. Peak A reagiert mit 2 Seren grenzwertig positiv, mit 2 weiteren Seren schwach positiv. Die positiven Resultate werden im PRICK nicht bestätigt. Das Serum eines der beiden im PRICK für Peak A positiven Probanden verhält sich im RAST für Peak A grenzwertig. Peak D reagiert mit 2 Seren grenzwertig und mit einem Serum positiv. Der Salzpeak zeigt sich im PRICK in jedem Fall allergen-negativ.

3.1.3. Hämoglobine im Vergleich

3.1.3.1. Charakteristik

Die bis jetzt kristallisierten und teilweise bzw. vollständig sequenzierten Hämoglobine der Larven *Chironomus thummi thummi* wurden uns von der Forschungsgruppe Prof. Braunitzer freundlicherweise überlassen.

Die Nomenklatur der Hämoglobinbanden (I, IIB, IIIa, IV, VI, VIIA, VIIB, VIII, IX, X) erfolgte nach ihren R_f -Werten in der analytischen Polyacrylamid-Disc-Elektrophorese (23) bzw. nach der Reihenfolge ihrer Elution von DEAE-Cellulose (20).

Die drei monomeren (I, III, IV) (64, 25, 81) und die sechs dimeren (IIB, VI, VIIA, VIIB, IX, X) (63, 65, 69, 93, 94) Komponenten wurden bereits in ihrer Primärstruktur aufgeklärt. Die Kettenlänge der sequenzierten Globine beträgt zwischen 136 und 151 Aminosäuren, wobei die unpolaren Aminosäuren einen großen Anteil haben. Der paarweise Vergleich homologer Strukturen (21, 22) der sequenzierten Chironomiden-Hämoglobine (Abb. 6.2. Anhang) anhand der topologischen Kriterien, die zusammen mit der jeweiligen Primärstruktur publiziert wurden (25, 63, 64, 65, 69, 81, 93, 94) zeigt, daß sich zwischen 34% (Bezug zur längeren Kette) und 73% (betrifft Ketten gleicher Länge) der Aminosäuren in identischen Positionen befinden.

3.1.3.2. Allergenaktivität

Alle 11 untersuchten Hämoglobine sind im RAST mit 10 der 11 eingesetzten Seren unserer Studiengruppe allergen-aktiv (Abb. 3.1.3.2.a).

Gegenüber den Monomeren I und III können wir in einem Serum keine spezifischen IgE nachweisen. Der PRICK-Test an diesem Probanden führt zum gleichen Ergebnis.

Die RAST-Werte für zehn Personen des Kontrollkollektivs liegen bei allen Hämoglobinen unter 0,3 U/ml.

Zwischen den einzelnen Hämoglobinbanden besteht ein Unterschied in der Allergenität bezogen auf das gleiche Serum. Die relative Bindungskapazität der einzelnen Hämoglobinkomponenten variiert in Abhängigkeit vom Serum (Abb.3.1.3.2.b). Die prozentualen Aktivitäten der Hämoglobinbanden beziehen sich auf das Gesamthämoglobin, das alle Larvenhämoglobine in unterschiedlicher, von uns nicht bestimmter Konzentration, enthält. Die Aktivität einzelner Hämoglobinbanden ist mit mehreren Seren höher als die des Gesamthämoglobins (Abb.3.1.3.2.b) (Tab.3.1.3.2.a). Die allergene Potenz der 11 Hämoglobinbanden zeigen wir anhand der Verteilung der relativen Aktivitäten in den 11 Studienserien (Tab.3.1.3.2.a).

Tab.3.1.3.2.a. Verteilung der relativen Allergenaktivitäten der 11 Hämoglobine in 11 sensibilisierten Seren.

Aktivität % Hb _{ges.}	I	IIB	III	IIIa	IV	VI	VIIA	VIIB	VIII	IX	X
	Hämoglobine										
> 50%	5	11	2	8	5	8	10	11	4	7	3
> 60%	5	9	1	7	3	6	6	9	4	6	2
> 70%	4	7	-	6	3	5	4	9	2	3	1
> 80%	2	4	-	4	2	4	4	6	1	3	-
> 90%	2	4	-	3	1	4	2	6	1	2	-
> 100%	2	4	-	3	1	2	2	6	-	1	-
Anzahl der sensibilisierten Seren, die den entsprechenden Anteil der Gesamt-Hämoglobin-Aktivität pro Einzel-Hämoglobin zeigen (n=11).											

Die Komponenten IIB und VIIB erweisen sich im RAST am aktivsten. IIB und VIIB erreichen in jedem Fall mehr als 50% der Aktivität des Gesamthämoglobins.

III und X konnten in 7 Seren nur die geringste Menge spezifischer IgE binden.

Abb.3.1.2.b Variabilität der prozentualen Allergenaktivitäten des einzelnen Hämoglobins im Hinblick auf verschiedene Allergiker-Seren, beispielhaft dargestellt anhand von 5 beliebig ausgewählten Patientenseren unserer Studiengruppe (s.2.2.). Die unterschiedlichen Symbole kennzeichnen die verschiedenen Seren. Die RAST-Allergen-Aktivität des Einzel-Hämoglobins wird ausgedrückt in % Aktivität des Gesamt-Hämoglobins mit den jeweils entsprechenden Seren.

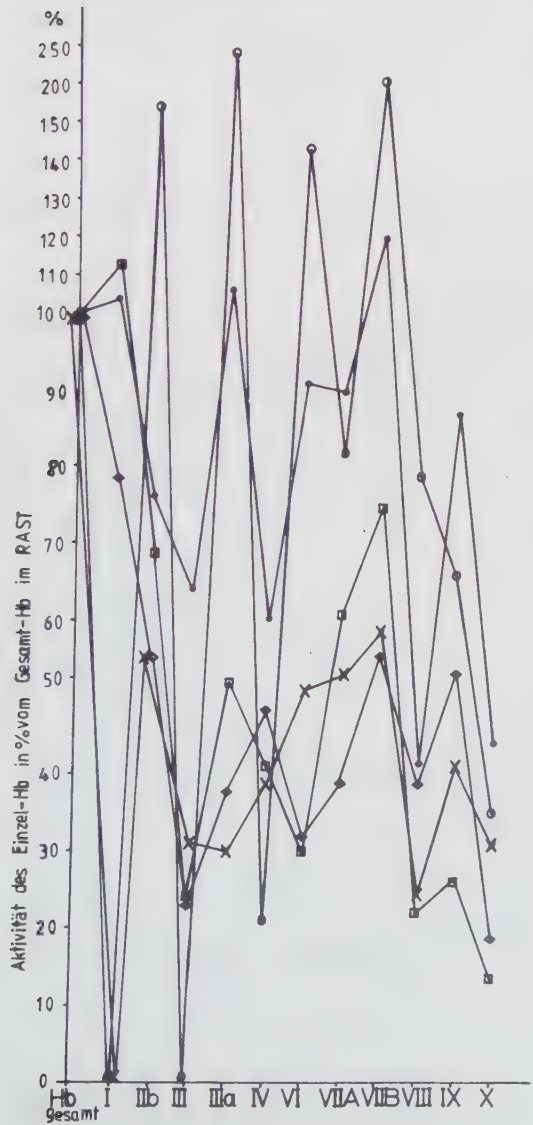


Tabelle 3.1.3.2.b stellt die PRICK- und RAST-Resultate für die Hämoglobine III und VI gegenüber.

Hämoglobin VI ist in allen 10 Seren signifikant aktiver. Der PRICK-Test mit dieser Komponente ist immer positiv. Hämoglobin III erscheint im RAST einmal negativ sowie einmal grenzwertig. Dies spiegelt sich in negativen PRICK-Resultaten wieder. Die Hämoglobine I, IIB, IV, VIIA, VIIB, IX und X werden im Hauttest nur teilweise untersucht. Die Komponente I führt bei mehreren Sensibilisierten zu schwächeren PRICK-Reaktionen, die bei einem Probanden negativ ausfallen.

Tab.3.1.3.2.b. Gegenüberstellung der Prick- und RAST-Resultate der Hämoglobine III und VI.

Patient a)	PRICK ϕ in mm				RAST U/ml	
	III ^{b)}	VI ^{b)}	Histamin ^{c)}	Kontrollsg. ^{d)}	III	VI
G.K.	9	12PS	7	0	9,2	22,8
B.H.	20PS	7	5	0	0,54	0,75
F.J.	10PS	12	3	0	14,1	32,8
T.F.	5	7	3	0	322,0	726,0
J.I.	25PS	20PS	7	0	190,0	324,0
P.K.	4	6	6	0	1,3	3,3
S.W.	12	16	5	0	10,8	23,0
W.K.	0	6	9	0	0,13	9,4
M.K.	5	6	4	0	33,6	46,9
M.A.	0	4	5	0	0,48	0,76
Kontr. ^{a)} x n=9 s	0	0	4,0 $\pm 1,3$	0	0,07 $\pm 0,06$	0,06 $\pm 0,06$

a) 10 Patienten unserer Studiengruppe, 9 Personen unseres Kontrollkollektivs (s.2.2.)

b) Allergenkonzentration: 0,1 mg/ml

c) Histamin: 1,0 mg/ml

d) Kontrolllösung: 0,9% NaCl - 0,4% Phenol

PS Pseudopodien

Es wird fast immer (7x100%, 1x99%, 1x98%, 1x97%, 1x96%, 1x95%) eine vollständige Inhibition erreicht durch 0,4 mg HbVI pro 1 ml Serum. Die Komponente HbVIIB ist schon bei 0,01 mg HbVI pro 1 ml Serum zu 96% inhibierbar.

Bei dieser Inhibitionskonzentration erreicht HbI eine Inhibitionsrate von nur 57%.

Da der Vergleichs-RAST-Wert für HbVIIB mit dem zur Inhibition verwendeten Serum größer ist als derjenige für die anderen Hämoglobine, zeigt HbVIIB auch die beste absolute Inhibierbarkeit in diesen Versuchen.

3.1.4. Hämoglobin VI und seine Fragmente

3.1.4.1. Bronchialer Provokationstest mit Hämoglobin VI

Das Hämoglobin VI erweist sich im bronchialen Provokationstest mit einer 27 Jahre alten Person unserer Studiengruppe biologisch aktiv. Der Atemwegswiderstand steigt von 1,8 cm H₂O/l/sec nach dem Leerversuch bis zum maximalen Atemwegswiderstand von 5,8 cm H₂O/l/sec 20 Minuten nach Inhalation von 0,2 ml Allergenlösung (1 µg HbVI/ml) an. Nach vorübergehender Normalisierung ist der Atemwegswiderstand vier Stunden später erneut auf 4,3 cm H₂O/l/sec angestiegen.

3.1.4.2. BrCN-Spaltung von Globin VI

Das Apo-Hämoglobin VI wurde mit BrCN gespalten. Die Peptide sollen durch Gelchromatographie isoliert werden (Abb.3.1.4.2.). Das Chromatogramm dieser Trennung zeigt neben den beiden deutlichen Gipfeln (A, B) auch zwei kleinere schlecht definierte Erhebungen (C, D).

Peak A umfaßt die Fraktionen 30-39. Er enthält das größte BrCN-Peptid, die Partialsequenz 38-140 (VI₃₈₋₁₄₀). Das N-terminale Peptid VI₁₋₃₇ ist in den Fraktionen 47-55, Peak B, gelöst. Die beiden kleinen BrCN-Peptide VI₁₄₁₋₁₄₅, VI₁₄₆₋₁₄₇ können mit Biogel P30 nicht aufgetrennt werden. Die entsprechenden Fraktionen, 80-110, wurden vereinigt. Die Allergenität des lyophilisierten Peptidpools untersuchten wir später. Durch Endgruppenbestimmung wird nachgewiesen,^{†)} daß die beiden größeren Peptide VI₁₋₃₇ und VI₃₈₋₁₄₀ den theoretischen Erwartungen entsprechen.

[†] Durchführung von Dr.H.Aschauer

Abb.3.1.4.2. Fraktionierung der BrCN-Peptide.

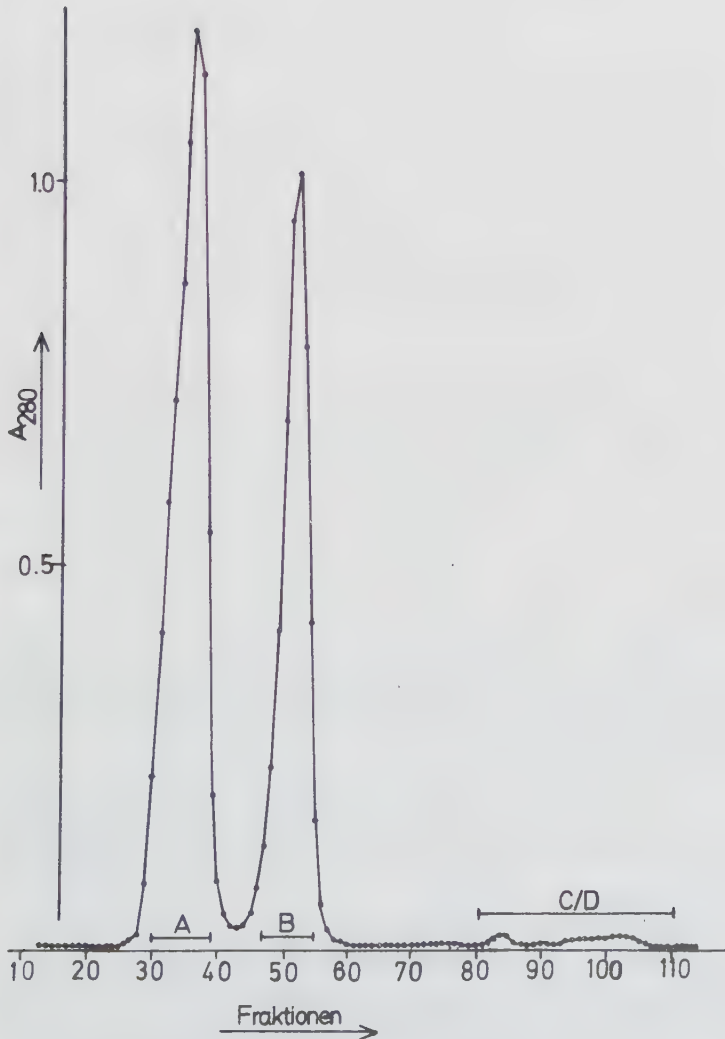
Gel: Biogel P-30, 100-200 mesh

Säule: 2,5 x 110 cm

Puffer: 0,1 M Tris HCl in 6 M Guanidin HCl pH 8,5

Durchfluß: 20 ml/h

Fraktionsvolumen: 5 ml



Die Einwaage des Lyophilisates beträgt:

Peak A : VI₃₈₋₁₄₀ : 267 mg

Peak B : VI₁₋₃₇ : 36 mg

Peak C/D : VI_{141-145/146-147} : ca. 4 mg +)

Beim Studium ihrer allergenen Eigenschaften bereiten diese Peptide Schwierigkeiten aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit.

3.1.4.3. Vorversuche: Überprüfung der Stabilität der allergen-aktiven Region

Der Vergleich der Aktivität von HbVI, Globin VI sowie der BrCN-Peptide von Globin VI (Tab.3.1.4.3.a) mit Hilfe eines sensibilisierten Serums, durchgeführt zur Überprüfung des Einflusses von Häm-Abspaltung, BrCN-Spaltung und tryptischer Spaltung, zeigt einen Abfall der Allergenität von HbVI über Globin VI bis zu VI₃₈₋₁₄₀.

Tab.3.1.4.3.a. RAST- und Prick-Resultate von Hämoglobin VI, Globin VI, sowie der BrCN-Peptide.

	HbVI	GbVI	VI ₃₈₋₁₄₀	VI ₃₈₋₁₄₀ trypt.	VI ₁₋₃₇	VI ₁₄₁₋₁₄₅ 146-147		
RAST U/ml	S.W. ^{a)}	40,8	22,0	15,0	7,2	0,2	0,23	
	Kontr. ^{b)}							
	x n=9	0,06	0,07	0,08	nb	0,06	nb	
	±s	0,06	0,04	0,02	nb	0,05	nb	
PRICK ^{d)} Ø in mm	S.W. ^{a)}	16	nb	14PS	nb	0	nb	5
	Kontr. ^{b)}							
	x n=9	0	0	0	0	0	4,8	0
	±s						1,3	0

a) mittelgradig sensibilisierte Person unserer Studiengruppe (s.2.2.);

b) Kontrollkollektiv (s.2.2.)

c) tryptische Peptide von VI₃₈₋₁₄₀ - noch nicht aufgetrennt;

d) Proteinkonzentration der Testlösungen: 0,1 mg/ml

e) Histamin: 1,0 mg/ml

f) Kontrolllösung: 0,9 % NaCl - 0,4 % Phenol

+) theoretisch zu erwartende Peptidsequenzen

Das N-terminale BrCN-Peptid VI₁₋₃₇ sowie die beiden C-terminalen BrCN-Peptide VI_{141-145/146-147} sind negativ. Das im RAST positive BrCN-Peptid VI₃₈₋₁₄₀ erweist sich auch im PRICK als positiv.

Die Allergenaktivität dieses Peptides bleibt auch nach tryptischer Spaltung für das Peptidgemisch (Tab.3.1.4.3.a Spalte 4) erhalten, weshalb sich diese Spaltung für die weitere Auftrennung anbietet.

Die kreuzweise Inhibition von HbVI, Globin VI und VI₃₈₋₁₄₀ zeigt Tabelle 3.1.4.3.b.

Tab.3.1.4.3.b Inhibition von Hämoglobin VI, Globin VI, Peptid VI₃₈₋₁₄₀ und vice versa.

Disc-Allergen			
	HbVI	GbVI	VI ₃₈₋₁₄₀
Inhibitor	HbVI 0,4 mg/ml	100%	94%
	GbVI 0,5 mg/ml	95%	99%
	VI ₃₈₋₁₄₀ 0,5 mg/ml	50%	52%
			100%

Die Inhibitionskonzentration der beiden Globine im Serum (0,5 mg/ml) wurde etwas höher gewählt als die des Hämoglobins (0,4 mg/ml). Die Eigeninhibition ist nahezu vollständig. Hämoglobin VI kann durch Globin VI vollständig inhibiert werden und vice versa. Das allergen-aktive BrCN-Peptid bindet, gelöst im Serum, 50% bzw. 52% der spezifischen IgE für das an Discs gekoppelte Hämoglobin VI bzw, Globin VI.

Hämoglobin VI bzw. Globin VI inhibieren die RAST-Aktivität von VI₃₈₋₁₄₀ zu 83%.

3.1.4.4. Tryptische Spaltung des Peptides VI₃₈₋₁₄₀

Durch Trennung der tryptischen Spaltprodukte des Peptides VI₃₈₋₁₄₀ erhalten wir drei Peptidpools A, B, C (Abb.3.1.4.4.),

die folgende Fraktionen umfassen:

Pool A : Fraktionen : 27 - 62

Pool B : Fraktionen : 63 - 76

Pool C : Fraktionen : 77 - 110

Abb.3.1.4.4. Fraktionierung der tryptischen Spaltprodukte
des Peptides VI₃₈₋₁₄₀.

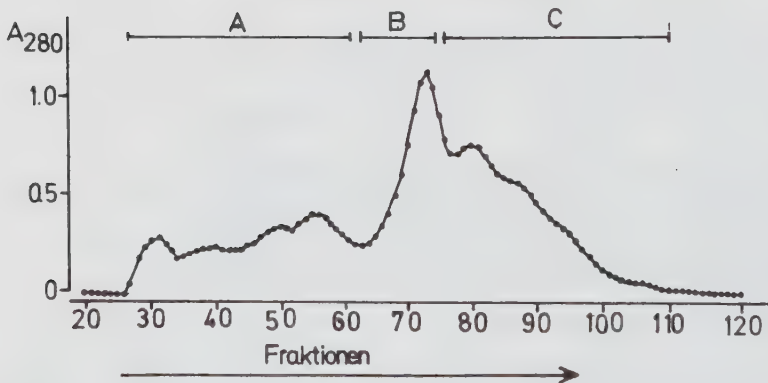
Gel: Biogel P-30, 100-200 mesh

Säule: 2,5 x 110 cm

Puffer: 0,1 M Tris HCl pH 8,5 / 6 M Guanidin HCl

Durchfluß: 20 ml/h

Fraktionsvolumen: 5 ml



3.1.4.5. Allergenaktivität der tryptischen Peptide von VI₃₈₋₁₄₀

Alle drei Pools sind sowohl im PRICK als auch im RAST allergen-aktiv (Tab.3.1.4.5.). Pool A und B verhalten sich bei einem schwächer sensibilisierten Serum im RAST negativ.

Tab. 3.1.4.5. Allergenaktivität der tryptischen Peptidpools des Peptides VI₃₈₋₁₄₀.

Patient ^{a)}		VI ₃₈₋₁₄₀	VI ₃₈₋₁₄₀	VI ₃₈₋₁₄₀	VI ₃₈₋₁₄₀		
		Pool A	Pool B	Pool C			
RAST U/ml	M.K.	40,0	8,2	4,6	7,5		
	S.W.	15,0	5,7	1,5	3,4		
	P.K.	2,0	0,07	0,2	0,45		
	M.A.	0,45	nb	nb	nb		
						Hist ^{c)}	Kontr. ^{d)}
PRICK Ø in mm	M.K.	3	nb	nb	nb	4	0
	S.W.	14	7	8	12PS	5	0
	P.K.	5	nb	nb	5	6	0
	M.A.	3	3	1,5	1,5	5	0

- a) vier Patienten unserer Studiengruppe (s.2.2.)
b) Allergenkonzentration der Testlösungen: 0,1 mg/ml
c) Histamin: 1,0 mg/ml
d) Kontrollösung: 0,9% NaCl - 0,4% Phenol
PS Pseudopodien
nb nicht bestimmt

3.1.4.6. RAST-Studien von Hämoglobin VI und seinen Fragmenten

Die Allergeneigenschaften von Hämoglobin VI und seinen Derivaten wurde vergleichend gegenübergestellt (Tab.3.1.4.6.). Mit den 11 Seren unserer Studiengruppe wurden im RAST folgende Substanzen getestet: Hämoglobin VI, Globin VI, die beiden BrCN-Peptide VI₁₋₃₇, VI₃₈₋₁₄₀, sowie die vier tryptischen Peptide^{+) VI₃₁₋₅₇, VI₉₉₋₁₄₇, VI₁₁₈₋₁₄₇, VI₉₉₋₁₀₉, wobei das letztere an Lysin modifiziert ist.}

Betrachtet man die Allergenaktivität von Hämoglobin VI und Globin VI vergleichend, unter Beachtung der mittleren Streuung von $\pm 11\%$, so erzielen die Globin-Disks mit 5 Seren niedrigere, mit 4 Seren gleiche und mit 2 Seren höhere RAST-Resultate als die Hämoglobin-Scheiben.

Das BrCN-Peptid VI₃₈₋₁₄₀ erweist sich in allen 11 Seren allergen-aktiv. Diese Partialsequenz erreicht zwischen 84% und 33% der Bindungskapazität von Globin VI, abhängig vom eingesetzten Serum. Mit allen getesteten Seren zeigt VI₃₈₋₁₄₀ geringere RAST-Resultate als das ungespaltene Globin.

^{+) Überlassen von Dr.H.Aschauer}

Tab. 3.1.4.6. RAST-Studien mit Hämoglobin VI und seinen Fragmenten

Patient a)	RAST										PRIST
	VI										
	Hb	Gb	1-37	38-140	31-57	99-147	99-109 ^{c)}	118-147	IgE ges. U/ml		
G.K.	U/ml	22,6	20,4	0,18	11,0	0,05	0,76	0,09	0,05	63	
	% b)		0	54	0	3	0	0	0		
B.H.	U/ml	0,8	1,4	0,15	0,56	0,04	0,2	0,05	0,06	13	
	% b)		3	35	0	7	0	0	0		
F.J.	U/ml	32,6	19,9	0,75	13,3	0,5	0,56	0,42	0,4	520	
	% b)		3	67	2	2	1	1	1		
T.F.	U/ml	726	603	4,7	390	9,7	8,2	0,9	0,45	420	
	% b)		1	65	2	1	0	0	0		
J.I.	U/ml	324	216	10,2	181	27,6	13,5	4,7	1,7	2008	
	% b)		5	84	13	6	2	1	1		
P.K.	U/ml	3,3	3,1	0,59	2,04	0,1	0,15	0,19	0,08	290	
	% b)		16	66	0	2	3	0	0		

Z.K.	U/ml	46	34,4	0,2	11,2	5,5	0,53	0,27	0,16	507
	% b)		0	35	16	1	0	0	0	
S.U.	U/ml	40,8	22	0,2	15	0,2	0,9	0,34	1,3	88
	% b)		0	68	0	3	1	5		
U.K.	U/ml	9,4	3,4	0,1	1,5	0,05	0,09	0,06	0,04	nb
	% b)		0	44	0	0	0	0	0	
P.A.	U/ml	0,8	1	0,1	0,45	0,14	0,17	0,09	0,06	500
	% b)		0	39	4	7	0	0	0	
P.K.	U/ml	47	94	0,2	40	0,38	0,8	0,34	0,11	706
	% b)		0	42	0	1	0	0	0	
Kontr. a)	U/ml	0,06	0,07	0,06	0,08	0,05	0,07	0,07	0,06	25
± s	U/ml	0,06	0,04	0,05	0,02	0,05	0,03	0,04	0,05	21

a) Patientenkollektiv, Kontrollkollektiv (s.2.2.)

b) Anteil der Globinaktivität in %

c) Peptid an Lys modifiziert

nb nicht bestimmt

Das N-terminale BrCN-Peptid VI₁₋₃₇ führt mit 7 der 11 untersuchten sensibilisierten Seren zu RAST-Werten unter 0,35 U/ml. Das Peptid verhält sich mit einem Serum grenzwertig positiv. Mit den 3 deutlich positiven Seren (0,59 U/ml; 4,72 U/ml; 10,24 U/ml) beträgt der Aktivitätsanteil von Globin VI 16%, 1% bzw. 5%.

Das chymotryptische Peptid VI₃₁₋₅₇ erzielt im RAST mit 6 Seren Resultate unter 0,35 U/ml. Dieses Peptid verhält sich zweimal grenzwertig und dreimal positiv mit 5,5 U/ml (16% Globinaktivität), 9,7 U/ml (2% Globinaktivität), 27,58 U/ml (13% Globinaktivität).

Das tetra-tryptische Peptid VI₉₉₋₁₄₇ verhält sich im RAST beim Testen mit unseren 11 Seren viermal negativ, fünfmal grenzwertig und zweimal positiv mit 8,16 U/ml (1% Globinaktivität) bzw. 13,54 U/ml (6% Globinaktivität).

Das tryptische Peptid VI₁₁₈₋₁₄₄ erscheint im RAST mit 7 sensibilisierten Seren negativ, mit 2 weiteren Studienserien grenzwertig. Mit diesem Peptid konnte man in 2 Seren niedrig-positive Resultate messen von 1,7 U/ml (1% Globinaktivität) und 1,3 U/ml (5% Globinaktivität).

Das tryptische an Lysin modifizierte Peptid VI₉₉₋₁₀₉ wird anhand der RAST-Studien achtmal negativ, zweimal grenzwertig und einmal positiv mit 4,7 U/ml (2% Globinaktivität) bewertet. Die positiven RAST-Werte für die tryptischen Peptide werden im wesentlichen mit vier stark sensibilisierten Seren erzielt, mit einer Gesamt-IgE-Konzentration von mehr als 400 U/ml. Die positiven RAST-Resultate betragen nur zwischen 0,01% und 5% der Globinaktivität.

3.1.4.7. PRICK-Test mit Hämoglobin VI und seinen Fragmenten

Im PRICK wurden folgende Substanzen auf ihre Allergeneigenschaften getestet: Hämoglobin VI, VI₁₋₃₇, VI₃₁₋₅₇, VI₃₈₋₁₄₀, VI₁₁₈₋₁₄₇.

Das BrCN-Peptid VI₃₈₋₁₄₀ zeigt sich bei allen 11 Probanden unserer Studiengruppe eindeutig positiv (Tab.3.1.4.7.).

Tab.3.1.4.7. PRICK-Test mit Hämoglobin VI und seinen Fragmenten

Patient ^{a)}	Prick ϕ in mm					Hist ^{b)}	K.-Lsg. ^{c)}
	Hb	VI ^{d)}					
		1-37	38-140	31-57	118-147		
G.K.	12PS	0	8	0	0	7	0
P.H.	7	0	12	0	0	5	0
F.J.	12	3	5	0	2	3	0
T.F.	7	0	5	0	0	3	0
J.I.	20PS	0	7	0	0	7	0
P.K.	4	2	5	0	0	6	0
Z.K.	17	0	10	0	0	6	0
S.W.	16	0	14PS	0	0	5	0
W.K.	6	0	4	0	0	9	0
M.K.	6	0	3	0	0	4	0
M.A.	4	0	3	0	0	5	0
Kontr. ^{a)}							
$\bar{x}$ n=9	0	0	0	0	0	4,8	0
±s						1,3	

a) Patientenkollektiv, Kontrollkollektiv (s.2.2.)

b) Histamin: 1,0 mg/ml

c) Kontrolllösung: 0,9% NaCl - 0,4% Phenol

d) Konzentration von HbVI und seinen Derivaten: 0,1 mg/ml

PS Pseudopodien

Die biologische Aktivität ist nur viermal wesentlicher geringer (d in mm: 17/10; 20/7; 12/5; 12/8) als die des Hämoglobin VI. Bei einem Probanden zeigt sich VI₃₈₋₁₄₀ reaktiver als Hämoglobin VI (d in mm: 12/7).

Das N-terminale Peptid VI₁₋₃₇ führt bei einer Patientin zu einer positiven Reaktion, in deren Serum auch im RAST spezifische IgE gegen VI₁₋₃₇ nachzuweisen sind.

Der positive PRICK-Test bei einem schwächer sensibilisierten Patienten für dieses Bruchstück findet sein Analogon in der

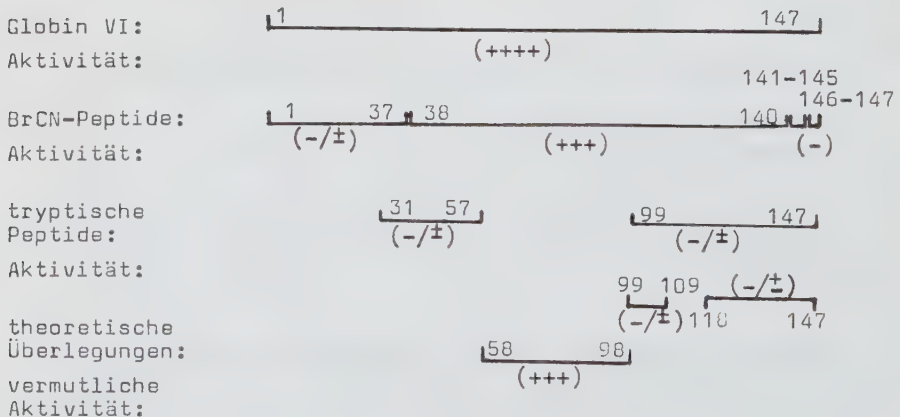
16%-igen Globinaktivität dieses Peptides in der RAST-Studie. Darüber hinaus kann im PRICK-Test für die Peptide VI₁₋₃₇, VI₃₁₋₅₇, VI₁₁₈₋₁₄₇ keine biologische Aktivität nachgewiesen werden.

3.1.4.8. Vergleich der Aktivitäten überlappender Peptidsequenzen

Wie aus den Untersuchungen 3.1.4.6. und 3.1.4.7. zu erkennen, ist das Peptid VI₃₈₋₁₄₀ eindeutig allergen-aktiv, während sich die kleineren Peptide meistens negativ bzw. schwach positiv verhalten.

Durch Vergleich der Bindungskapazitäten sich überlappender Partialsequenzen läßt sich auf den Bereich des Globin VI, der für die spezifische IgE-Bindung wesentlich ist, schließen (Abb.3.1.4.8.). Die geringen Partialaktivitäten der Peptide in Bezug auf Globin VI gelten als grenzwertig.

Abb.3.1.4.8. Vergleich der Aktivitäten überlappender Peptidsequenzen

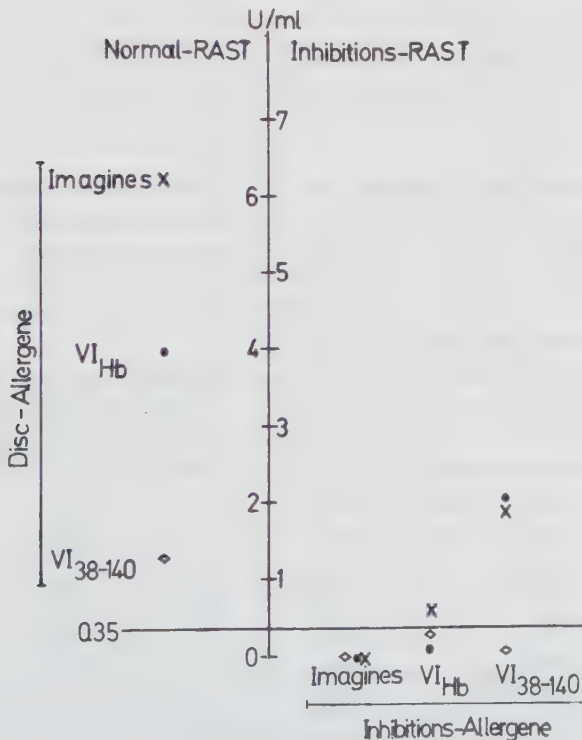


Die positive Partialsequenz VI₃₈₋₁₄₀ kann durch die beiden negativen bzw. grenzwertigen Peptide VI₃₁₋₅₇ und VI₉₉₋₁₄₇ auf die verbleibende Sequenz VI₅₈₋₉₈ eingegrenzt werden.

3.1.5. Allergene Verwandtschaft zwischen Imaginesextrakt und Larvenkomponenten

Die aufgrund ähnlicher RAST-Resultate (s.3.1.1.1.) vermutete allergene Verwandtschaft zwischen dem Imaginesextrakt und den allergen-aktiven Larvenkomponenten Hämoglobin VI sowie Peptid VI₃₈₋₁₄₀ wurde im Inhibitions-RAST näher untersucht (Abb.3.1.5.).

Abb.3.1.5. Allergene Verwandtschaft zwischen Imaginesextrakt, Hämoglobin VI sowie Peptid VI₃₈₋₁₄₀. Das gleiche Symbol steht für das gleiche Disc-Allergen.



Die Eigeninhibition ist jeweils vollständig. Das Imagines-
extrakt bindet alle spezifischen IgE, die mit Hämoglobin VI
bzw. VI₃₈₋₁₄₀ reagieren.

Frei gelöstes Hämoglobin VI inhibiert den RAST auf Imagines-
extrakt nahezu vollständig (94%).

Die Inhibitionsrate für frei gelöstes VI₃₈₋₁₄₀ gegenüber
Imaginesextrakt-Scheiben beträgt 72%.

3.2. Screening-Untersuchung von Exponierten

3.2.1. Anamnese, Hauttest, RAST

94 Personen, die mit roten Mückenlarven Kontakt hatten, wur-
den im Rahmen dieses Screenings untersucht. 55 der Unter-
suchten zeigen in mindestens einem der drei Verfahren, Anam-
nese, PRICK, RAST positive Befunde.

Bei 94 Exponierten wurde eine Anamnese erhoben, die bei 54
Probanden positiv zu bewerten ist. Wieviele der Patienten
die einzelnen Beschwerden, die für diese Typ I Allergie
charakteristisch sind, angegeben haben, ist aus Tab.3.2.1.a
ersichtlich.

Tab.3.2.1.a Screening-Untersuchung von Exponierten: Vertei-
lung der Symptome in den positiven Anamnesen in
Abhängigkeit von RAST- und PRICK-Resultaten.

Verteilung der Symptomatik			
Symptomatik	aller pos. Anamnesen	bei pos.Anamn. bei pos.RAST bei pos.PRICK	bei pos.Anamn. bei neg.RAST bei pos./neg.PRICK
Rhinitis	81,5%	90%	83%
Conjunctiv.	72%	80%	58%
Urticaria, Haut-S.	85%	50%	58%
Bronchit.S.	56%	65%	50%
Asthmatis.S.	58%	75%	41%
Vasomot.S.	17%	20%	16%
	n=54	n=20	n=12

30 der untersuchten Personen leiden jeweils an Rhinitis, Conjunktivitis, Urticaria, Bronchitis und Asthma. Vergleicht man die prozentuale Verteilung der Symptome zwischen RAST-positiven und RAST-negativen Probanden, fällt auf, daß 70% der erstgenannten über asthmatische Beschwerden klagen, gegenüber 41% der letzteren. 80% der RAST-positiven Beschwerdeträgern berichten von einer Conjunktivitis, während nur 58% der RAST-negativen Patienten diese Beschwerden angeben. Untersuchte mit negativen RAST-Resultaten leiden Überdies an weniger Symptomen als nachweislich Sensibilisierte. Ausgelöst wird die Symptomatik laut der positiven Anamnesen, die durch positive RAST-Resultate bestätigt werden, bei Kontamination mit Staub gefriergetrockneter Larven, mit Dampf von Flüssigkeiten, die Bestandteile roter Mückenlarven enthalten sowie bei Hautkontakt mit roten Mückenlarven, gefriergetrocknet, gefroren oder gelöst.

Im Hauttest und RAST werden als Allergene folgende isolierte Imagines- und Larvenkomponenten eingesetzt: Imaginesextrakt, Gesamt-Hämoglobin, Hämoglobin VI, Peptid VI₃₈₋₁₄₀. 72 exponierte Personen werden mit Anamnese, PRICK und RAST untersucht. Bei 33 der Untersuchten ist mindestens einer der Tests positiv (Tab.3.2.1.b).

Tab. 3.2.1.b Screening-Untersuchung: 72 Exponierte untersucht mit Anamnese, PRICK, RAST.

A	R	P	n
+	+	+	20
+	+	-	0
+	-	-	7
-	+	+	0
-	-	+	1
+	-	+	5
-	-	-	39

A: Anamnese

R: RAST

P: PRICK

n: Anzahl der Personen

n gesamt = 72

Der RAST ist nur dann positiv, wenn auch Anamnese und PRICK positiv ausfallen, was bei 20 der Exponierten zutrifft (Tab.3.2.1.c).

Bei 5 Patienten fallen nur Anamnese und PRICK positiv aus. Ein Patient ohne Allergie-Beschwerden reagiert nur im Hauttest positiv. 7 Anamnesen sind positiv zu bewerten, ohne daß dies in den allergie-diagnostischen Test bestätigt wird.

Die Korrelation der drei diagnostischen Verfahren, Anamnese, PRICK und RAST wird anhand der Testergebnisse der 72 exponierten Personen dargestellt (Tab.3.2.1. c/d/e).

Tab.3.2.1.c/d/e Korrelation der drei diagnostischen Verfahren:
Anamnese, PRICK, RAST bei n=72 exponierten Pers.

c.	RAST			Gesamtübereinstimmung: (66/72) 92%
	n=72	+	-	
	PRICK	+	20 6	
		-	0 46	

d.	RAST			Gesamtübereinstimmung: (60/72) 83%
	n=72	+	-	
	Anamnese	+	20 12	
		-	0 40	

e.	PRICK			Gesamtübereinstimmung: (64/72) 89%
	n=72	+	-	
	Anamnese	+	25 7	
		-	1 39	

Die Koinzidenz zwischen Anamnese und RAST beträgt 83% (60/72). Anamnese und PRICK korrelieren in 89% der untersuchten Fälle (64/72). PRICK und RAST stimmen in 92% (66/72) überein.

Tabelle 3.2.1.f zeigt die Befunde der 20 in Anamnese, RAST und PRICK positiven Allergikern in Form von Fallbeispielen Zwischen der Gesamt-IgE-Konzentration des Serums und dem Ausmaß der im RAST nachweisbaren Sensibilisierung läßt sich kein Zusammenhang erkennen.

3.2.2. Arbeitsplatzbezogener Expositionstest

Bei zehn gegenüber roten Mückenlarven exponierten Personen mit positiver Anamnese, die in der Fischfutterverarbeitung tätig sind, wurde der Atemwegwiderstand oszillatorisch gemessen, vor Arbeitsbeginn sowie nach dreistündiger Verarbeitung von roten Mückenlarven.

Patientin F.J. mußte schon nach fünfminütiger Inhalation des Larvenextraktes den Arbeitsplatz aufgrund starker subjektiver Beschwerden verlassen.

Bei 5 von 7 über Dyspnoe klagenden Personen ist ein Anstieg des Atemwiderstandes objektivierbar.

Wir ermitteln bei den beiden in Anamnese, PRICK und RAST positiven Patienten F.J. und S.E.M. einen Atemwegswiderstandsanstieg von 3,0 cm H₂O/l/sec auf 4,25 cm H₂O/l/sec bzw. von 2,6 cm H₂O/l/sec auf 3,8 cm H₂O/l/sec.

Patient G.R., Anamnese und Hauttest positiv, zeigt einen R_{aw}-Anstieg von 8,0 cm H₂O/l/sec auf 9,75 cm H₂O/l/sec.

Bei zwei weiteren Beschwerdeträgern ist eine Zunahme des Atemwiderstandes von 3,0 cm H₂O/l/sec auf 3,7 cm H₂O/l/sec bzw. von 3,0 cm H₂O/l/sec auf 3,6 cm H₂O/l/sec meßbar.

Tab.3.2.1.f Fallbeispiele: Befunde der 20 in Anamnese,
RAST und PRICK positiven Patienten.

Patient	t Expos.	Art der Expos.	Symptomatik						RAST U/ml			
			R	C	U	B	A	V	Imag.	Hb ges.	HbVI	VI 38-140
E.U.	8a	Fischfutterverarbeitung	+	-	-	-	+	-	47,9	113,3	135,9	30
F.C.	8a		+	+	-	+	-	-	0,41	0,34	0,4	0,06
F.J.	10a		+	+	+	+	+	+	8,2	4,7	6,6	2,7
J.I.	10a		+	-	+	+	+	+	389	414	389,5	176
D.R.	11a		+	+	-	+	+	-	552	375	94,4	181
R.A.	2a		-	-	-	+	+	-	131	245,4	118,6	80,2
S.E.	0,75a		+	+	+	+	+	+	10,4	244	32,2	8,4
S.M.	7a		+	+	-	+	+	-	9,6	14,3	19,1	4,6
S.H.	3a		+	+	+	-	+	-	1,8	2,1	2,9	0,5
T.E.	2a		+	+	+	-	+	-	0,9	1	0,2	0,3
T.F.	4a	Forschung	+	+	-	+	+	-	752	692	726	390
W.E.	8a		+	+	+	+	+	+	122,8	117	484	51
S.W.	4a		+	+	+	+	+	-	79,5	45	41	15
P.K.	4a	Forschung	+	+	+	-	-	-	4,5	4,9	3,3	2
M.A.	2,5a		+	+	+	-	-	-	2,8	1,5	0,8	0,5
G.K.	5a	Zierfischhaltung	-	+	-	+	+	-	44	38,6	22,8	11
B.H.	3a		+	+	-	-	+	+	1,6	1,9	0,8	0,6
Z.K.	?		+	+	-	-	-	-	63,4	77,8	46	11,2
D.G.	1,5a		+	-	-	+	+	-	196,6	173,2	159,4	75,4
W.K.	?		+	+	-	+	-	-	5,4	6,6	9,4	1,5

R: Rhinitis

C: Conjunctivitis

U: Urticaria, Hautsymptomatik

B: Bronchitische Symptomatik

A: Asthmatische Symptomatik

V: Vasomotorische Symptomatik: Kopfschmerzen, Migräne, Schwindel

PRICK $\varnothing$ in mm					IgE ges. U/ml	Anmerkungen/ weitere Allergien
HbVi ^{a)}	VI ^{b)} 38-140	Imag. ^{c)}	Hist. ^{d)}	K.-Lsg. ^{e)}		
15	8	11	3	0	388	Pollen Hausstaub
7	3	7	5	2	17	
12	6	6	3	0	520	
20PS	7	15PS	7	0	2500	Hausstaub Katzenhaare
10PS	8PS	10	4	0	145	Co, Käse, Chrysantheme
15PS	7PS	7	6	0	860	Pollen, z. Zt. Hyposen
6PS	4	15PS	4	0	25	
16PS	7	9	4	0	88	
10PS	5	8PS	4	0	144	
0	0	4	6	0	8	Abfüllen v. RML → Urticaria
7	5	10PS	3	0	420	PRICK → Rhinitis
15	6	10	4	0	80	
16	14PS	nb	5	0	88	
6	5	10	6	0	290	
4	3	5	5	0	500	
12PS	8	18PS	7	0	63	Tubifex Pollen
7	12	nb	5	0	13	
nb	nb	12	6	0	507	
4	5	8	6	0	1200	Tubifex Pollen
6	4	8	9	0	nb	

- a) b) Allergenkonzentration: 0,1 mg/ml
 c) Allergenkonzentration: 0,4 mg/ml
 d) Histamin: 1,0 mg/ml
 e) Kontrolllösung: 0,9% NaCl - 0,4% Phenol
 nb nicht bestimmt
 PS Pseudopodien
 RML Rote Mückenlarven
 Co Kobalt

4. Diskussion

4.1. Zur Methodik

4.1.1. PRICK

Im PRICK werden die Allergene auf ihre biologische Aktivität hin untersucht, d.h. auf ihre Fähigkeit eine Mastzelldegranulation und damit die Freisetzung von Histamin und anderen Mediatoren zu veranlassen (52).

Dies erfordert polyvalente, mindestens jedoch bivalente Antigene (51, 75, 79). Monovalente Peptide, die im PRICK zu keiner Hautreaktion führen, sind trotzdem in der Lage spezifische IgE zu binden.

Darüber hinaus sind im PRICK-Test die Allergenmengen, die in die Epidermis gelangen, nicht genau definiert, weshalb von der Hautreaktion nur näherungsweise auf die Allergenpotenz geschlossen werden darf.

4.1.2. RAST

Die Durchführung des RAST setzt voraus, daß die Allergene kovalent an aktivierte Cellulosescheiben gekoppelt werden. Die Beschickung der Scheiben wird bei pH 8,2 vorgenommen, was die partielle Dissoziation der dimeren Hämoglobine (58) und somit die Zerstörung ihrer Quartärstruktur zur Folge hat. Die Kopplung von Allergenen über eine freie Amino-Gruppe (16) (2.3.2.1.1.) kann zur Veränderung der Konformation gegenüber dem nativen Molekül führen und somit einen Antigenitätsverlust bewirken (17).

Die Immobilisierung der Allergene an Cellulose-Discs kann die spezifische IgE-Bindung ebenfalls beeinträchtigen (99). Es ist darüber hinaus vorstellbar, daß die kovalente Cellulosebindung eine Ladungsänderung in kleinen Peptiden zur Folge hat, was die Antigen-Antikörper-Interaktion, die im wesentlichen polarer Natur sein soll (13, 15, 16), modifizieren kann.

4.1.3. RAST-Inhibitionstest

Alle Inhibitionen, beschrieben in dieser Arbeit, wurden mit dem Serum eines Probanden durchgeführt. Dies kann zu Fehl-

schlüssen führen, da die spezifischen IgE aus mehreren Subpopulationen bestehen, die bei verschiedenen Personen unterschiedlichen Anteil haben (58).

Wie aus Tierversuchen bekannt, ändert sich die Qualität der spezifischen Antikörper mit der Sensibilisierungszeit (17, 86, 87) und somit auch die funktionelle Identität der Antigendeterminanten. Inwieweit diese Feststellung auf das humane IgE-System Übertragbar ist, bleibt noch zu untersuchen. Es ist darüberhinaus bedenklich, die Inhibierbarkeit von Allergenen mit dem Serum einer Person zu beurteilen, da die Antikörpersynthese der genetischen Kontrolle unterliegt (78).

4.1.4. Zerlegung von Hämoglobin VI

Die Antigendeterminante eines nativen Proteins wird beeinflusst bzw. gebildet durch die Aminosäuresequenz und die dreidimensionale Struktur (13, 47, 48).

Während des Zerlegens von HbVI, wie Häm-Abspaltung, chemische Spaltung, enzymatische Spaltung werden Tertiär- und Sekundärstruktur immer mehr zerstört, weshalb sich primär die Aminosäuresequenzen der Peptide der antigenen Beurteilung stellen. Konformationsänderung, Längenänderung, Ladungsänderung, Änderung der energetischen Verhältnisse sind u.a. die Faktoren, die die Allergeneigenschaften von Partialsequenzen beeinflussen (2, 10, 12, 16, 66, 67). Durch Spalten der Globinkette kann überdies die sequentiale Antigendeterminante destruiert werden.

4.1.5. Isolierung der Fragmente

Die Trennung der einzelnen Peptide durch Gelchromatographie schließt nicht aus, daß die einzelnen Fragmente etwas verunreinigt sind. Die Partialsequenzen von Globin VI können bis zu 2% Verunreinigungen enthalten (7).

4.1.6. Vergleich Überlappender Peptidsequenzen

Wenn man auf eine antigen-positive Region m.H. Überlappender negativer Peptide schließt, setzt man voraus, daß es sich um eine sequentiale Determinante handelt, die in der Primärstruktur

tur verankert ist. Eine Antigendeterminante, die durch räumliche Anordnung von Aminosäure-Seitenketten gebildet wird (16), kann durch Vergleichen überlappender Peptidsequenzen nicht erkannt werden. Die Bedeutung von Aminosäuren außerhalb der antigenen Region für deren Struktur (2, 10, 16) wird ebenfalls nicht berücksichtigt, weshalb die indirekt eingegrenzte anitgen-aktive Region dies nicht bestätigen muß. Es bleibt ebenfalls zu überprüfen, inwieweit bei der entsprechenden tryptischen Spaltung die Antigendeterminanten von VI₃₈₋₁₄₀ zerstört wurden. Theoretischen Überlegungen, basierend auf dem Sensibilisierungsmodus durch natürliche Kontamination, berechtigen die Hypothese einer sequenzabhängigen Allergendeterminanten, weshalb der Vergleich überlappender Peptidsequenzen als Näherungsverfahren erlaubt ist. Dies wird dadurch unterstützt, daß die 5 Antigendeterminanten des Wal-Myoglobins Partialsequenzen des Globins darstellen (13). Auch bei Allergen M des Kabeljaus scheint die Primärstruktur wesentlich mehr für die Allergenaktivität verantwortlich zu sein als die Konformation (30).

4.2. Besprechung der Ergebnisse

Die unter den angegebenen Versuchsbedingungen erzielten Ergebnisse werden im weiteren diskutiert, ohne die Einschränkungen (4.1.) zu berücksichtigen.

Die allergenen Komponenten von Larven und Imagines sind in den jeweiligen Extrakten enthalten.

In allergologischen Studien mit Larvenextraktfraktionen stellen sich die Hämoglobine als die einzigen allergenaktiven Bestandteile der Larven dar. Zwischen diesen Chironomiden-Hämoglobinen und den humanen Häm-Globin-Komponenten, α -Kette, β -Kette und Myoglobin, sind durchschnittlich 80% der Aminosäuren ausgetauscht (22). Dieser geringe Verwandtschaftsgrad spricht nicht gegen die allergene Wirkung der Chironomiden-Hämoglobine. Die Quartärstruktur der dimeren Komponenten wurde nicht berücksichtigt. Die monomere Fraktion scheint etwas weniger reaktiv als die Fraktion der dissoziierten Dimeren, was mit gewissen Einschränkungen durch das Verhalten der einzelnen Hämoglobinbanden bestätigt wird.

Die 11 bis jetzt kristallisierten Hämoglobine sind alle allergen-aktiv. Zwischen den homologen Globinen, mit 34% (Bezug zur längeren Kette) bis 73% (betrifft Ketten gleicher Länge) identischen Aminosäuren, bei einer Kettenlänge zwischen 136 und 151 Aminosäuren, besteht ein Unterschied in der Allergenaktivität. Es ist kein Zusammenhang zwischen dem Allergenitätsgrad und der Ähnlichkeit im Hinblick auf die Primärstruktur erkennbar. Die beiden aktiveren Hämoglobine II und VIIIB haben 77 Aminosäuren in identischen Positionen. Die beiden weniger reaktiven Komponenten III und X stimmen in 58 Aminosäuren überein.

Vergleicht man die sequentielle Ähnlichkeit der Hämoglobine gegensätzlicher Aktivitätstendenz, so stellt man fest, daß II und X 67 identische Aminosäuren sowie III und VIIIB 62 identische Aminosäuren in gleichen Positionen tragen.

Patient W., durch PRICK und RAST nachweisbar, stark sensibilisiert, zeigt sich gegenüber den beiden Monomeren I und III, die in 61 Aminosäuren übereinstimmen, inert. Dies bestätigt die Hypothese, daß es sich bei den homologen Hämoglobinen nicht um identische Allergendeterminanten handelt. Trotz unterschiedlicher Aktivität sind alle 11 Hämoglobine mit HbVI vollständig inhibierbar. Die Komponente VIIIB ist besser, die Komponente I schlechter inhibierbar, was sich nicht im homologen Verwandtschaftsgrad zwischen Hämoglobin VI und den beiden Hämoglobinen widerspiegelt.

HbVI teilt mit den 10 inhibierten Hämoglobinen zwischen 67 und 86 identische Aminosäuren.

Für die Inhibition mit HbVI besteht funktionelle Identität, trotz der strukturellen Unterschiede zwischen den einzelnen Hämoglobinen und der Differenzen in der Bindungskapazität. Diese funktionelle Gleichheit der Antigendeterminanten impliziert weitgehende Übereinstimmung in der Bindungsenergie zwischen Determinanten und spezifischen IgE. Wie aus anderen Berichten bekannt, setzt funktionelle allergene Gleichheit keine vollständige strukturelle Übereinstimmung voraus (11, 14, 70). Auch garantiert eine identische Aminosäuresequenz keine Kreuzreaktion zwischen Peptiden (47).

Das Phänomen, daß manche Hämoglobine aktiver sind als Hämoglobin VI, aber durch letzteres inhibiert werden, legt die Vermutung nahe, daß die durch Inhibition inaktivierten Antikörper notwendig wären, um die Bindung weiterer Subpopulationen von Antikörpern an die entsprechenden Hämoglobine zu gewährleisten. Hämoglobin VI, das sich auch im bronchialen Provokationstest aktiv zeigt, wurde weiter allergologisch untersucht.

Der Porphyrinring, identisch mit dem Porphyrin der Wirbeltierhämoglobine, Protoporphyrin IX (95), scheint keinen direkten Einfluß auf die Allergenität zu haben, wie schon berichtet, bei Wal-Myoglobin (82) und Human-Hämoglobin (83). Hämoglobin VI als auch Globin VI stellen abhängig vom Serum mal die aktivere, mal die weniger aktive Komponente dar. Ist im Falle der geringeren Globinaktivität die Konformationsveränderung verantwortlich zu machen, so könnte für die größere Aktivität des Globins die bessere Zugänglichkeit des Antikörperbindungsortes ursächlich sein.

Auch die Natur der sensibilisierenden Allergene, ob denaturiert oder nativ, beeinflußt die Aktivitäten der entsprechenden Komponenten.

Wie bei allen bekannten Inhalationsallergenen (61), stellen auch bei der Larve *Chironomus thummi thummi* die globulären Proteine die wesentliche allergene Komponente dar.

Die kleineren Globinfragmente VI₁₋₃₇, VI₃₁₋₅₇, VI₉₉₋₁₄₇, VI₁₁₈₋₁₄₇, VI₉₉₋₁₀₉ sind im PRICK nicht reaktiv, was jedoch nicht ausschließt, daß sie gewisse strukturelle Anteile einer Antigen determinanten tragen.

Im RAST verhalten sich die kleinen Peptide negativ, grenzwertig bzw. positiv bei geringen prozentualen Aktivitäten der Globinkette. Die geringen Aktivitäten, nur mittels weniger Patienten nachzuweisen, können auf folgenden Gegebenheiten basieren:

- Verunreinigung der Peptide bis zu 2% (7);
- es handelt sich um Minor-Determinanten, gegenüber derer nur wenige Patienten sensibilisiert sind;
- es handelt sich um strukturelle Relikte einer vollständigen, durch das Procedere weitgehend zerstörten Allergen-

determinanten;

- es handelt sich um Artefakte, die mit gewissen Subpopulationen der spezifischen IgE reagieren.

In den 3 zuletzt angeführten Möglichkeiten tragen die Peptide Regionen ähnlicher Struktur wie die in Frage kommende Antigen determinante. Hier binden die kleinen Peptide Klone der antigenspezifischen IgE. Die geringen Bindungskapazitäten dieser Partial-Antigen-Determinanten machen sich primär in IgE-reichen Seren bemerkbar, da hier die relative Menge dieser Subpopulationen größer ist. Haben diese einen größeren Anteil an den gesamten antigen-spezifischen IgE, können die kleinen Peptide auch in schwächer sensibilisierten Seren aktiv wirken, was bei unseren Versuchen in zwei Fällen vorkommt. Auch die zweiprozentige Verunreinigung der Peptide macht sich u.a. in hochsensibilisierten Seren bemerkbar.

Eindeutig allergen-positiv verhält sich das Peptid VI₃₈₋₁₄₀ in RAST und PRICK, auch wenn die Allergenaktivität geringer ist als die des ungespaltenen Globin VI. Über geringere Allergenaktivität von Spaltprodukten, die intakte Antigen determinanten tragen, wird auch in anderen Publikationen berichtet (9, 12, 66, 67). VI₃₈₋₁₄₀ bindet nur 50% bzw. 52% der spezifischen IgE, die mit HbVI bzw. Globin VI reagieren. Die positive Reaktivität von VI₃₈₋₁₄₀ im PRICK läßt vermuten, daß das Peptid mindestens bivalent ist (51, 75, 79).

Durch überlappende Peptidsequenzen der beiden negativen bzw. grenzwertigen Peptide VI₃₁₋₅₇ und VI₉₉₋₁₄₇ wird die Region, die für die spezifische IgE-Bindung verantwortlich ist, auf VI₅₈₋₉₈ eingegrenzt. Die Aminosäuresequenz dieser Region unterscheidet sich nicht auffallend von der der negativen bzw. grenzwertigen Peptide. Die bis jetzt aufgeklärten "continuous-Determinanten" in Wal-Myoglobin (18) und "discontinuous-Determinanten" in Lysozym (15) enthalten vor allem polare Aminosäuren. Untersucht man VI₅₈₋₉₈ unter diesem Aspekt, fällt auf, daß zwar der Anteil der polaren Aminosäuren nicht größer ist als in den negativen Peptiden, doch hier zwei His und zwei Arg von den drei His und drei Arg des Globins VI aufzufinden sind. Ob diese Aminosäuren von Bedeutung sind, ist

zweifelhaft, zumal His in E7 und His in F11 als mögliche Kontaktstellen für Häm diskutiert werden (6). Das Peptid VI₅₈₋₉₈ umfaßt folgenden Bereich des Hämoglobin VI (6, 57): Helix E (19As), Segment EF (8As), Helix F (12As), Segment FG (2As). Es handelt sich also größtenteils um die hydrophobe Tasche zwischen Helix E und F, in der auch die Hämgruppe liegt (24). Ordnet man das HbVI der Human- β -Kette homolog zu, entspricht der Bereich VI₅₈₋₉₈ der Region E4 bis FG3. Hämoglobin VI und das Imaginesextrakt haben die gleiche funktionelle Antigen determinante, was sich an der kreuzweise vollständigen Inhibition zeigt. Peptid VI₃₈₋₁₄₀ bindet nur einen gewissen Teil der mit dem Imaginesextrakt-Disc reagierenden spezifischen IgE (z.B. einige Klone der multiklonalen spezifischen IgE), was auf die Konformationsänderung des Spaltproduktes zurückgeführt werden kann. Die funktionelle Identität zwischen Larvenallergen und Imaginesallergen läßt vermuten, daß die Hämoglobine bzw. ihre Abbauprodukte die Allergene der Imagines darstellen, da beim Übergang der Larve zum Puppenstadium der Abbau des Hämoglobins beginnt (84). Die geschlüpfte Mücke ist oft grün gefärbt. Diese Farbe nimmt auch die Hämoglobinlösung an, wenn man sie längere Zeit stehen läßt. Möglicherweise handelt es sich bei dem grünen Farbstoff um Biliverdin mit noch intaktem Globin bzw. Globinfragment.

4.3. Zur Natur der Allergendeterminanten

Die Allergendeterminante, wie sie sich uns während unseren allergologischen Studien darstellte, läßt sich nur operational beschreiben als der Bereich, der die allergenspezifischen IgE bindet. Die Antikörperbindungsregion ist ein komplexes Konstrukt, sowohl von der Primärstruktur als auch von der Konformation abhängig, wie dies auch für andere Allergene beschrieben wurde (31, 43, 55, 58). Verschiedene Modifikationen der Allergendeterminanten führen zu unterschiedlichen Allergenaktivitäten, was wohl von der Menge der gebundenen spezifischen IgE abhängt. Dies unterstreicht die These, daß die spezifischen IgE aus mehreren Subpopulationen zusammengesetzt sind mit unterschiedlichen Subspezifitäten (53). Betrachtet man den Einfluß des chemischen Procedere auf

Hämoglobin VI kann man annehmen, daß die Primärstruktur für die Formation dieser Allergendeterminanten wesentlich ist. Dies ist auch der Fall bei den Antigendeterminanten von Walmyoglobin (13) sowie von Allergen M des Kabeljaus (30).

4.4. Zur Screening-Untersuchung

Die Art und Weise der Exposition, die die Symptomatik auslöst, zeigt, daß es sich bei den Chironomidenallergenen um Inhalationsallergene handelt.

Der große Anteil der Beschwerdeträger (85%) mit Hautsymptomatik ist aus der Form der Kontamination zu erklären. Wie den Ergebnissen und dem Expositionsmodus zu entnehmen, wirken nicht die nativen Larven bzw. Mücken sensibilisierend, sondern die in der Hämolymphe frei gelösten Hämoglobine bzw. Hämoglobine und deren Abbauprodukte in der Körperflüssigkeit der Imagines. Die Voraussetzung zur Sensibilisierung ist somit die **Zerkleinerung** bzw. die Trocknung von Larven und Imagines.

50% unserer Patienten klagen über asthmatische Beschwerden. Was die Koinzidenz zwischen den angewandten allergiediagnostischen Methoden angeht, so zeigt sich eine hohe Übereinstimmung zwischen PRICK und RAST. Eine geringere Korrelation besteht zwischen Anamnese und PRICK sowie zwischen Anamnese und RAST, wo sich unter anderem die Problematik der falsch positiven Anamnesen bei unbekannter Allergie gegenüber anderen Stoffen sowie bei Beschwerden infolge unspezifischer Reizeffekte an der Schleimhaut, bemerkbar macht.

5. Zusammenfassung

Die Allergeneigenschaften der nicht-stechenden Insektenart *Chironomus thummi thummi* (Diptera) wurden untersucht.

Die Extrakte von Larven und Imagines enthalten die allergenen Komponenten.

Das Larvenextrakt wurde mit Sephadex G-75 in 4 Peaks aufgetrennt. Nur die beiden Hämoglobinfractionen verhalten sich in RAST und PRICK aktiv. Die Bindungskapazität der dimeren Hämoglobine für spezifisches IgE ist durchschnittlich grösser. Die beiden Nicht-Hämoglobingipfel zeigen sich allergennegativ bzw. grenzwertig.

Die 11 bis jetzt kristallisierten Larvenhämoglobine erweisen sich in RAST und PRICK alle allergen-aktiv mit signifikantem Unterschied in der IgE-Bindungskapazität.

Die Hämoglobinbanden II und VIIB erzielen durchschnittlich die höchsten RAST-Resultate, III und X die schwächsten. Die gleiche Allergenaktivitäts-Tendenz zwischen den einzelnen Hämoglobinen spiegelt sich nicht im homologen Verwandtschaftsgrad wider.

Im RAST-Inhibitionstest ist die Antigenaktivität aller 11 Hämoglobine durch 0,4 mg/ml Hämoglobin VI vollständig inhibierbar, wobei Hämoglobin VIIB am besten und Hämoglobin I am schlechtesten kreuzreagiert. Dieses unterschiedliche Verhalten korreliert nicht mit der Ähnlichkeit der Primärstruktur zwischen Hämoglobin VI und Hämoglobin I bzw. Hämoglobin VIIB. HbVI, das die funktionellen Allergendeterminanten aller Hämoglobine enthält, wurde weiter untersucht. Die Komponente ist auch biologisch aktiv im bronchialen Provokationstest. HbVI und das durch Häm-Abspaltung mit Äthylmethylketon erhaltene Globin VI sind kreuzweise vollständig inhibierbar.

Das für die Allergenität verantwortliche Globin wurde nach BrCN-Spaltung über Biogel P30 in folgende Fragmente aufgetrennt: VI₁₋₃₇, VI₃₈₋₁₄₀, VI₁₄₁₋₁₄₅, 146-147.

Das einzige in RAST und PRICK eindeutig aktive BrCN-Peptid VI₃₈₋₁₄₀ inhibiert HbVI zu 50% und Globin VI zu 52%. Es reagiert auch nach tryptischer Spaltung als Peptidgemisch noch

allergen-positiv. Auftrennung der tryptischen Spaltprodukte über Biogel P30 führt zu 3 Peptidpools, die nach PRICK und RAST positiv zu beurteilen sind.

Das BrCN-Peptid VI₁₋₃₇ und die tryptischen Peptide VI₃₁₋₅₇, VI₉₉₋₁₄₇, VI₁₁₈₋₁₄₇ sowie das an Lys modifizierte tryptische Peptid VI₉₉₋₁₀₉ verhalten sich im RAST negativ, grenzwertig bzw. positiv mit einer Globinaktivität von 0,01% bis 5%. Diese kleineren Peptide zeigen im PRICK bis auf eine Ausnahme, VI₁₋₃₇ bei einer Patientin, keine Reaktion. Der spezifische IgE-Bindungsbereich, aktiv zu lokalisieren auf VI₃₈₋₁₄₀, läßt sich durch die beiden negativen bzw. grenzwertig-aktiven Peptide VI₃₁₋₅₇ und VI₉₉₋₁₄₇ indirekt auf den Bereich VI₅₈₋₉₈ eingrenzen. Diese Region umfaßt die E-Helix, das EF-Segment, die F-Helix und das FG-Segment des Hämoglobin VI. Die vollständige kreuzweise Inhibition zwischen HbVI und Imaginesextrakt zeigt, daß die gleichen funktionellen Allergendeterminanten in beiden Allergenen vorhanden sind. VI₃₈₋₁₄₀ inhibiert das Imaginesextrakt zu 72%.

94 Personen, gegenüber roten Mückenlarven exponiert, wurden mit Anamnese und/oder PRICK und/oder RAST untersucht. In den allergologischen Tests wurden die folgenden isolierten allergenen Komponenten angewandt: Imaginesextrakt, Gesamt-Hämoglobin, HbVI, VI₃₈₋₁₄₀. Bei 55 der untersuchten Personen ist in mindestens einem der diagnostischen Verfahren ein Hinweis auf eine Chironomiden-Allergie vorhanden. 54 Anamnesen sind positiv zu bewerten. Das Beschwerdebild ist für eine Typ I Allergie charakteristisch. Der die Symptomatik auslösende Expositionsmodus zeigt, daß es sich um ein Inhalationsallergen handelt. Von 72 der Exponierten, die mit allen 3 diagnostischen Verfahren untersucht wurden, sind 33 Personen in mindestens einem Test positiv, davon 20 Personen mit allen drei Methoden, 5 Personen nur in Anamnese und PRICK, eine Person nur im PRICK, 7 Personen nur in den Anamnesen.

Die Koinzidenz zwischen PRICK und RAST beträgt 92%, zwischen Anamnese und PRICK 89%, zwischen Anamnese und RAST 83%.

Zwischen der Gesamt IgE-Konzentration im Serum und dem Aus-

maß der im RAST nachweisbaren Sensibilisierung besteht kein Zusammenhang. Im arbeitsplatzbezogenen Expositionstest bei 10 mit roten Mückenlarven beschäftigten Personen war bei 5 von 7 über Dyspnoe Klagenden ein leichter Anstieg des Atemwiderstandes objektivierbar.

[illegible]

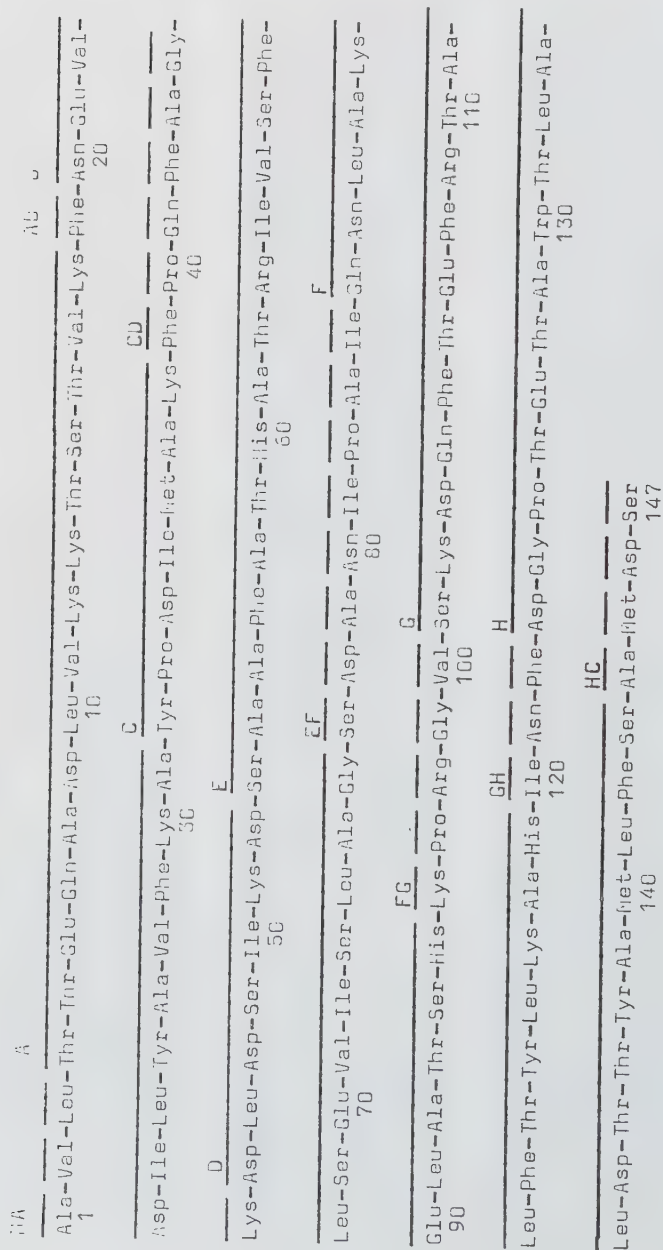
IIG Ala-Asn-Met-Pro-Ala-Met-Glu-Thr-Leu-Ile-Lys-Asp-Met-Ala-Asn-His-Lys-Ala-Arg-Gly
 I Ala-Asn-Thr-Pro-Thr-Ile-Leu-Ala-Lys-Ala-Lys-Asp-Phe-Gly-Lys-Ser-His-Lys-Ser-Arg-Ala-
 IX Ser-Asn-Ala-Pro-Ala-Asp-Ala-Thr-Leu-Ile-Arg-Thr-Leu-Glu-Ser-Thr-Ser-His-Ala-Arg-Gly
 X Gly-Asn-Gln-Ala-Ala-Ile-Arg-Thr-Leu-Leu-His-Asp-Leu-Gly-Val-Phe-His-Lys-Thr-Arg-Gly
 VIIIB Ser-Asn-Ala-Ala-Ala-Val-Gln-Gly-Leu-Leu-Asp-Lys-Leu-Gly-Asp-His-Lys-Ala-Arg-Gly
 III Pro-Asn-Ile-Glu-Ala-Asp-
 IV Pro-Asn-Ile-Asp-Gly-Asp-
 VI Ala-Asn-Ile-Pro-Ala-Ile-Gln-Asn-Leu-Ala-Lys-Glu-Leu-Ala-Thr-Ser-His-Lys-Pro-Arg-Gly-
 FG

VIIA 110
 IIG Ile-Ser-Gln-Ala-Gln-Phe-Asn-Glu-Phe-Arg-Ala-Gly-Leu-Val-Ser-Tyr-Val-Ser-Ser-Asn-
 I Ile-Pro-Lys-Ala-Gln-Phe-Asn-Glu-Phe-Arg-Ala-Ser-Leu-Val-Ser-Tyr-Leu-Gln-Ser-Lys-Leu-
 IX Ala-Ser-Pro-Ala-Gln-Leu-Asp-Asn-Phe-Arg-Lys-Ser-Leu-Val-Val-Tyr-Leu-Lys-Gly-Ala-Thr-
 X Ile-Thr-Lys-Gly-Gln-Phe-Asn-Glu-Phe-Arg-Ser-Ser-Leu-Val-Ser-Tyr-Leu-Ser-Ser-His-Ala-
 VIIIB Val-Ser-Ala-Ala-Gln-Phe-Gly-Glu-Phe-Arg-Gly-Thr-Met-Thr-Ala-Tyr-Leu-Lys-Gly-His-
 III Val-Thr-His-Asp-Gln-Leu-Asn-Asn-Phe-Arg-Ala-Gly-Phe-Val-Ser-Tyr-Met-Lys-Ala-His-Thr-
 IV Val-Thr-His-Asp-Gln-Leu-Asn-Asn-Phe-Arg-Ala-Gly-Phe-Val-Ser-Tyr-Met-Lys-Ala-His-Thr-
 VI Val-Ser-Lys-Asp-Gln-Phe-Thr-Glu-Phe-Arg-Thr-Ala-Leu-Phe-Thr-Tyr-Leu-Lys-Ala-His-Ile-
 G

VIIA 130
 IIG Val-Ala-
 I Pro-Ala-Glu-Phe-Thr-Pro-Ala-Ala-Ala-Glu-Ser-Ala-Trp-Thr-Ala-Gly-Leu-Asp-Asn-Ile-Phe-Gly-
 IX -Lys-
 X Ser-
 VIIIB Trp-Asn-Asp-Ala-Thr-Ala-Asp-Ala-Trp-Thr-His-Gly-Leu-Asn-Ile-Phe-Gly-
 III Trp-Gly-Asn-Asn-Val-Ala-Ala-Ile-Ser-His-Ser-Trp-Asp-Asp-Ala-Phe-Asp-Lys-Ala-Phe-Ser-
 IV Phe-Ala-Gly-Ala-
 VI Phe-Ala-Gly-Ala-
 H
 Asn-
 140
 Val-Ala-
 Pro-Ala-Glu-Phe-Thr-Pro-Ala-Ala-Ala-Glu-Ser-Ala-Trp-Thr-Ala-Gly-Leu-Asp-Asn-Ile-Phe-Gly-
 -Lys-
 Ser-
 Asn-
 Val-Ser-
 Asp-
 Asp-
 Asn-
 150
 Leu-Leu-Phe-Ala-Ala-Leu
 Val-Leu-Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg
 I Thr-Leu-Lys-Asn-Glu-Leu
 IX Met-Ile-Phe-Ala-His-Leu
 X Val-Ile-Phe-Glu-Val-Leu-Glu-Ser
 VIIIB Ile-Val-Val-Pro-Arg-Leu
 III Met-Ile-Phe-Ser-Lys-Pet
 IV Met-Val-Phe-Ala-Lys-Pet
 VI Met-Leu-Phe-Ser-Ala-Met-Asp-Ser-
 HC

VIIA 150
 IIG Leu-Leu-Phe-Ala-Ala-Leu
 I Val-Leu-Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg
 IX Thr-Leu-Lys-Asn-Glu-Leu
 X Met-Ile-Phe-Ala-His-Leu
 VIIIB Val-Ile-Phe-Glu-Val-Leu-Glu-Ser
 III Ile-Val-Val-Pro-Arg-Leu
 IV Met-Ile-Phe-Ser-Lys-Pet
 VI Met-Val-Phe-Ala-Lys-Pet
 HC

Abb.6.3. Sequenz des Hämoglobin VI von Chironomus thummi thummi (6). Die helicalen Bereiche nach homologer Zuordnung zur Human- α -Kette wurden eingezeichnet.



7. Literaturverzeichnis

1. Aas K:
Die Natur der Allergene.
Die gelben Hefte 20, 77-85, 1980
2. Andres SF, Atassi MZ:
Conformational studies on modified proteins and peptides.
Artificial myoglobins prepared with modified and metallo-
porphyrins.
Biochemistry 9, 2268-2275, 1970
3. Apold J, Elsayed S:
The immunochemical reactivity of regions encompassing Tyr 30
and Arg 75 of Allergen M from cod.
Molecular Immunology 17, 291-296, 1980
4. Arnon R, Sela M, Yaron A, Sober HA:
Polylysine-specific antibodies and their reaction with
oligolysines.
Biochemistry 4, 948-953, 1965
5. Aschauer H, Dissertation, TU Wien, 1978
6. Aschauer H, Zaidi ZH, Braunitzer G:
Die Primärstruktur eines dimeren Hämoglobins (Erythro-
cruorin) Komponente CTT VI von Chironomus thummi thummi.
Diptera.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1513-1516, 1979
7. Aschauer H, pers. Mitteilung.
8. Atassi MZ, Brown RK, Mc Ewan M:
Immunochemical studies of hemoglobin and the role of the
sulfhydryl-groups.
Immunochemistry 2, 379-389, 1965
9. Atassi MZ, Saplin BJ:
Immunochemistry of spermwhale myoglobin. I. The specific
interaction of some tryptic peptides and of peptides con-
taining all the reactive regions of the antigen.
Biochemistry 7, 688-698, 1968
10. Atassi MZ, Skalski DJ:
Immunochemistry of some artificial human hemoglobins.
Immunochemistry 6, 25-34, 1969

11. Atassi MZ, Tarlowski DP, Paull JH:
Immunochemistry of spermwhale myoglobin. VII. Correlation of immunochemical crossreaction of eight myoglobins with structural similarity and its dependence on conformation.
Biochim. Biophys. Acta 221, 623-635, 1970
12. Atassi MZ:
Specific recept. antibodies, antigens, cells.
Int. Convocation Immunol. Proc. 3rd; 118-136, 1972
13. Atassi MZ:
Antigenic structure of myoglobin: The complete immunochemical anatomy of a protein and conclusions relating to antigenic structures of proteins.
Immunochemistry 12, 423-438, 1975
14. Atassi MZ, Lee CL, Pai RC:
Enzymic and immunochemical properties of lysozyme.
Biochim. Biophys. Acta 427, 745-751, 1976
15. Atassi MZ, Lee CL:
The precise and entire antigenic structure of native lysozyme.
Biochem. J. 171, 429-434, 1978
16. Atassi MZ:
Precise determination of the entire antigenic structure of lysozyme.
Immunochemistry 15, 909-936, 1978
17. Atassi MZ, Sakata S, Kazim AL:
Localization and verification by synthesis of five antigenic sites of bovine serum albumin.
Biochem. J. 179, 327-331, 1979
18. Axen R, Porath J, Ernback S:
Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides.
Nature (London) 214, 1302-1304, 1967
19. Behlke J, Pfeil W, Blanck J, Ristau O, Rein H, Müller K, Mohr P, Scheler W:
Molekulare und komplexchemische Studien am Methämoglobin von Chironomus thummi thummi sowie einiger isolierter Fraktionen.
Acta Biol. Med. Ger. 34, 365-389, 1975

20. Braun V, Crichton RR, Braunitzer G:
On monomeric and dimeric insect hemoglobins (*Chironomus thummi*).
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 339, 197-210, 1968
21. Braunitzer G, Liebold B, Müller R, Rudloff V:
Der homologe chemische Aufbau der Peptidketten in Humanhämoglobin A.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 320, 170-172, 1960
22. Braunitzer G, Gehring-Müller R, Hilschmann N, Hilse K, Hobom G, Rudloff V, Wittman-Liebold B:
Die Konstitution des normalen adulten Humanhämoglobins.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 325, 283-286, 1961
23. Braunitzer G, Glossmann H, Horst J:
Zur Frage der nativen Hämoglobine der Larven von *Chironomus thummi thummi*.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1789-1791, 1968
24. Braunitzer G, Buse G, Gersonde K:
Molecular oxygen in biology: topics in molecular oxygen research, pp. 183-218, ed. by O. Hayaishi;
North Holland Publishing Company, 1974
25. Buse G, Steffens GJ, Braunitzer G, Steer W:
Hemoglobins XXV. Hemoglobin (Erythrocrucorin) CTT III from *Chironomus thummi thummi* (Diptera). Primary structure and relationship to other hemeproteins.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 89-97, 1979
26. Cannan RK:
Hemoglobin standard.
Science 127, 1376-1378, 1958
27. Ceska HM, Lundkvist HU:
A new and simple radioimmunoassay method for the determination of Ig E.
Immunochemistry 9, 1031-1034, 1972
28. Chapman MD, Platts-Mills TAE:
Purification and characterization of the major allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus*-Antigen P₁.
The Journal of Immunology 125, 587-592, 1980

29. Choudhury AM, Goodfriend L:
Differentiation between carrier and allergic determinants
in ragweed allergens Ra 3 and Ra 5.
Fed. Proc. 37, 1553-1559, 1978
30. Elsayed S, Aas KJ:
Observation on effect of denaturation on the allergenic
activity.
Allergy 47, 283-291, 1971
31. Elsayed S, Bennich H:
The primary structure of Allergen M from cod.
Scand. J. Immunol. 4, 203-208, 1975
32. Elsayed S, Apold J, Aas K, Bennich H:
The allergenic structure of Allergen M from cod. Tryp-
tic peptides of fragment TM 2.
Int. Archs. Allergy appl. Immun. 54, 171-175, 1977
34. English DS:
Ontogenetic changes in hemoglobin synthesis of two strains
of *Chironomus tentans*.
J. Embryol. Exp. Morphol. 22, 465-476, 1969
35. Freeman P:
Chironomidae (non-biting midges) in: Smith KGV (ed.)
Insects and other arthropods of medical importance.
The Trustees of the British Museum (Natural History).
189-191, London, 1973
36. Gad el Rab MO, Kay AB:
Widespread IgE-mediated hypersensitivity in the Sudan to
the "green nimity" midge *Cladotanytarsus lewisi* (Diptera:
Chironomidae). I. Diagnosis by radioallergosorbent test.
J. Allergy Clin. Immunol. in press
37. Gad el Rab MO, Thatcher DR, Kay AB:
Widespread IgE-mediated hypersensitivity in the Sudan to
the "green nimitti" midge *Cladotanytarsus lewisi* (Diptera:
Chironomidae). II. Identification of a major allergen.
Clin. Exp. Immunol. in press
38. Gell PGH, Coombs RRA (eds.):
"Clinical aspects of immunology", 2nd ed.
Blackwell, Oxford, 1968

39. Geha RS, Weinberg RP:
Anti-idiotypic antisera in man. I. Production and immuno-
chemical characterization of anti-idiotypic antisera to
human antitetanus antibodies.
J. Immunol. 121, 1518-1523, 1978
40. Giallongo A, Oreste U, Cocchiara R, Ruffilli A, Geraci D:
IgE and IgG antibodies compete for antigenic determinants
of *Parsetaria Officinalis* Allergen.
Molecular Immunology 17, 1019-1024, 1980
41. Gross E, Witkopp B:
Selective cleavage of the methionylpeptide bonds in
ribonuclease with cyanogen bromide.
J. Am. Chem. Soc. 83, 1510-1511, 1961
42. Habermann E, Jentsch J:
Sequenzanalyse des Melittins aus den tryptischen und
peptischen Spaltstücken.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 37-50, 1967
43. Habermann E:
Bee and wasp venoms.
Science 177, 314-322, 1972
44. Haux P, Sauerthal H, habermann E:
Sequenzanalyse des Bienengift-Neurotoxins (Apamin) aus
seinen tryptischen und chymotryptischen Spaltstücken.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 737-738, 1967
45. Hirs CHW:
Trypsin, in Enzyme Structure, Hirs CHW, ed.
Meth. Enzymol. 11, 217-222, 1967
46. Huber R, Formanek H, Epp O:
Kristallstrukturanalyse des Met-Erythrocyruorins bei 5,5 Å
Auflösung.
Naturwissenschaften 55, 75-77, 1968
47. Hurrell JGR, Smith JA, Todd PEE, Leach SJ:
Crossreactivity between mammalian myoglobins: Linear
VS spatial antigenic determinants.
Immunochemistry 14, 283-288, 1977
48. Hurrell JGR, Smith JA, Leach SJ:
Immunological measurements of conformational motility in
regions of the myoglobin molecule.
Biochemistry 16, 175-185, 1977

49. Hurrell JGR, Smith JA, Sydney JL:
The detection of five antigenically reactive regions in
the soyabean leghemoglobin a molecule.
Immunochemistry 15, 297-302, 1978
50. Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook HH:
Physio-chemical properties of human reaginic antibody.
J. Immunol. 97, 75-85, 1966
51. Ishizaka K, Ishizaka T:
Human reaginic antibodies and immunoglobulin E.
J. Allergy 42, 330-363, 1968
52. Ishizaka K:
In "The Antigens" (M Sela, ed.) 1
Academic Press, New York, pp. 479-528, 1973
53. Jain JE, Todd PE, Leach SJ:
On topographic antigenic determinants in myoglobins.
Molecular Immunology 17, 519-525, 1980
54. Johansson SGO, Bennich H, Berg T:
The clinical significance of Ig E.
Prog. Clin. Immunol. 1, 157-181, 1972
55. Johnson P, Marsh DG:
Allergens from common rye grasspollen (*lolium perenne*).
II. The allergenic determinants and carbohydrate moiety.
Immunochemistry 3, 101-116, 1966
56. Kay AB, Gad el Rab MO, Stewart J, Erwa HH:
Widespread IgE-mediated hypersensitivity in northern sudan
to the chironomid *Cladotanytarsus lewisi* ("green nimitti").
Clin. Exp. Immunol. 34, 106-110, 1978
57. Kendrew JC, Dickerson RE, Strandberg BE, Hart RG, Davies DR,
Phillips DC, Shore VC:
Structure of myoglobin.
Nature (London) 185, 422-427, 1960
58. King TP, Norman PS, Lichtenstein LM:
Studies on ragweed pollen allergens.
V. Ann. Allergy 25, 541-547, 1967
59. King TP:
Chemical and biological properties of some atopic allergens.
Adv. Immunol. 23, 77-105, 1976

60. King TP, Norman PS:
Antigens that cause atopic disease, in Immunological diseases, (Sauter M, ed.), Little, Brown a. Co., vol. 2 p. 787, Boston 1978
61. King TP:
Immunochemical properties of some atopic allergens. J. Allergy Clin. Immunol. 64, 159-163, 1979
62. Klapper DG, Goodfriend L, Capra JD:
The aminoacid sequence of ragweed allergen Ra3. in press
63. Kleinschmidt T, Braunitzer G:
Über die Primärstruktur eines dimeren Hämoglobins (Erythrocrucorin) von Insekten (Komponente IIB) von *Chironomus thummi thummi* (Insecta, Diptera).
Justus Liebig's Ann. Chem. 1060-1075, 1978
64. Kleinschmidt T, v. d. Mark-Neuwirth H, Braunitzer G:
The primary-structure of the monomeric hemoglobin (Erythrocrucorin) component CTT I of *Chironomus thummi thummi* (Insecta, Diptera)
Heterocycles 10, 251-256, 1978
65. Kleinschmidt T, Braunitzer G:
Primärstruktur des dimeren Insektenhämoglobins CTT VIIA (Erythrocrucorin) aus *Chironomus thummi thummi*, Diptera.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 933-942, 1980
66. Koketsu J, Atassi MZ:
Immunochemistry of sperm-whale myoglobin. XVIII. Accurate delineation of the single reactive region in sequence 120-153 by study of synthetic peptides.
Biochim. Biophys. Acta 328, 269-302, 1973
67. Koketsu J, Atassi MZ:
Immunochemistry of sperm-whale myoglobin - XVI: Accurate delineation of the single region in sequence 1-55 by immunochemical studies of synthetic peptides. Some conclusions concerning antigenic structures of proteins.
Immunochemistry 11, 1-8, 1974
68. Kreil G, Kreil-Kiss G:
The isolation of N-Formylglycine from a polypeptide present in bee venom.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, 275-280, 1967

69. Lalthantluanga R, Braunitzer G:
The primary structure of one of the dimeric hemoglobin
(Erythrocrucrin) components, CTT X, of *Chironomus thummi*
thummi (Diptera).
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 99-101, 1979
70. Lee CL, Pai RC, Atassi MZ:
Enzymic and immunochemical properties of lysozyme - XV.
Immunochimistry 13, 681-687, 1976
71. Levine BB:
Skin rashes with penicillin therapy: current management.
N. Engl. J. Med. 286, 42-43, 1972
72. Lowry GP, Roseborough NJ, Farr RA, Raudall RJ:
Protein measurement with folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275, 1951
73. Mage RG, Kabat EA:
Immunochemical studies on dextrans.
J. Immunol. 91, 633-640, 1963
74. Marsh DG:
Allergens and the genetics of allergy, in The antigens,
(Sela M, ed.), Academic Press, Inc., vol. 3, pp. 271,
New York 1975
75. Mancino D, Tigelaar R, Ovary Z:
Passive cutaneous anaphylactic and Schultz-Dale reactions
elicited in guinea pigs chemically univalent dinitrophenyl-
derivatives of Bacitracin A and Papain.
J. Immunol. 103, 750-756, 1969
76. Mole LE, Goodfriend L, Laphoff CB, Kehoe JH, Capra JD:
The amino acid sequence of ragweed pollen allergen Ra 5.
Biochemistry 14, 1216-1218, 1975
77. Nye L, Merrett TG, Landon J, White RJ:
A detailed investigation of circulating Ig E levels in
a normal population.
Clin. Allergy 5, 13-24, 1975
78. Okuda K, Twining SS, Atassi MZ, Davic CS:
Genetic control of T-Lymphocyte proliferative response
to sperm-whale myoglobin and its synthetic antigenic sites
in mice.
J. Immunol. 121, 1613-1622, 1978

79. Parler CW, Kern M Eisen HN:
Polyfunctional dinitrophenyl haptens as reagents for
elicitation of immediate type allergic skin responses.
J. exp. Med. 115, 789-801, 1962
80. Pepys J, Wells JD, D'Souza MFD, Greenberg M:
Clinical and immunological responses to enzymes of *Bacillus subtilis* in factory workers and consumers.
Clin. Allergy 3, 143-160, 1973
81. Pfletschinger J, Plagens H, Braunitzer G: unveröffentlicht
82. Prausnitz C, Küstner H:
Studies on supersensitivity.
Centralbl. Bakteriologie. 1 Abt. Origin 86, 160, 1921
83. Reichlin M, Hay M, Levine L:
Immunochemical studies of hemoglobin and myoglobin and
their globin moieties.
Biochemistry 2, 971-979, 1963
84. Roeder KD:
Insect Physiology, Wiley, New York, 1953
85. Sage HJ, Deutsch GF, Fasman GD, Levine L:
The serological specificity of the poly-alanine immune
system.
Immunochemistry 1, 133-144, 1964
86. Sakata S, Atassi MZ:
Immunochemistry of serum albumin.
Immunochemistry, in press
87. Sakata S, Atassi MZ:
Immunochemistry of serum albumin.
Biochim. Biophys. Acta 576, 322-332, 1979
88. Sakata S:
Immunochemistry of serum albumin.
Molecular Immunology 17, 139-142, 1980
89. Schechter B, Schechter J, Sela M:
Antibody combining sites to a series of peptide determi-
nantes.
J. Biol. Chem. 245, 1438-1447, 1970
90. Sela M:
Antigenicity: Some molecular aspects.
Science 166, 1365-1374, 1969

91. Shipolini RA, Bradbury AF, Callewaert GL, Vernon CA:
The structure of apamin.
Chem. Commun. 1967, 679-680, 1967
92. Shipolini RA, Callewaert GL, Cottrell RC, Vernon CA:
The primary sequence of phospholipase A from bee venom.
Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. 17, 39-41, 1971
93. Sladić-Simić D, Kleinschmidt T, Braunitzer G:
Analyse der Primärstruktur des dimeren Insektenhämoglobins CTT VIIB (Erythrocrucorin) aus *Chironomus thummi thummi*. Diptera.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 115-124, 1979
94. Steer W, Braunitzer G:
Die Sequenz eines dimeren Hämoglobins (Erythrocrucorin) Komponente CTT IX von *Chironomus thummi thummi* (Insecta Diptera).
Naturforsch. 34C, 882-884, 1979
95. Steffens GJ, Guse G: unveröffentlicht
96. Teale FWJ:
Cleavage of the hem-protein link by acid methylketone.
Biochim. Biophys. Acta 35, 546, 1959
97. Thienemann A:
Die Binnengewässer, Band XX, E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart 1954
98. Thumm J:
Lebendes Fischfutter im Winter.
Natur und Haus 16, 157-159, 1968
99. Twining JS, Atassi HZ:
Antibody combining sites can be mimicked synthetically.
J. Biol. Chem. 253, 5259-5262, 1978
100. Van Vunakis H, Kaplan J, Lehrer H, Levine L:
Immunogenicity of polylysine and polyornithine when complexed to phosphorylated bovine serum albumin.
Immunochemistry 3, 393-402, 1966
101. Wide L, Bennich H, Johansson SGO:
Diagnosis of allergy by an in vitro test for allergen antibodies.
Lancet 2, 1105-1112, 1967

102. Wide L:

Radioimmunoassays involving immunosorbents, in Karolinska Symposia on research methods in reproductive endocrinology, 1st symposium: Immunoassay of gonadotropins.

Acta Endocrinol. (Suppl.) 142, 207, 1969

103. Wigglesworth VB:

The principles of insect physiology (7th ed.)

Chapman and Hall, London 1972

104. Wölter W, Maier W, Bertan P:

Untersuchungen über die Hämolympheproteine der Chironomiden (Diptera).

Z. Naturforschung 24b, 110-116, 1969

Lebenslauf

18. 7. 1956 geboren in Edenkoben (Pfalz) als Tochter
von Herrn Anton Ziegler
und seiner Ehefrau Karola geb. Koch;
- 1963-1966 Besuch der Volksschule in Weyher;
- 1966-1972 Besuch der privaten Maria-Ward-Schule in
Landau (Pfalz);
- 1972-1975 Besuch des Eduard-Spranger-Gymnasiums in
Landau (Pfalz);
- 1975 Reifeprüfung am 27. 5. 1975;
- 1975-1977 vorklinisches Studium der Medizin an der
Eberhard-Karls-Universität Tübingen;
Physikum im SS 1977;
- 1977- klinisches Studium an der Ludwigs Maximilians-
Universität München;
- 1979, 1980 Anfertigung dieser Arbeit;

